

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL**



TESIS DOCTORAL

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
AISLADOS DE *Escherichia coli* DE ORIGEN
CLÍNICO Y FECAL EN GALLINAS
PONEDORAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

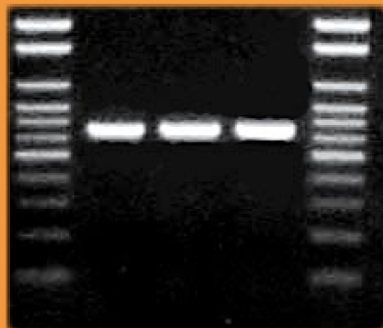
Magdalena Gibert Perelló

Bajo la dirección de los doctores:

Víctor Briones Dieste, Sonia Téllez Peña y Lucas Domínguez Rodríguez

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-2382-3



Departamento de Sanidad Animal
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Tesis Doctoral

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE AISLADOS DE
Escherichia coli
DE ORIGEN CLÍNICO Y FECAL
EN GALLINAS PONEDORAS**

Magdalena Gibert Perelló

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria

Madrid 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



TESIS DOCTORAL

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE
Escherichia coli DE ORIGEN CLÍNICO Y FECAL EN
GALLINAS PONEDORAS**

Dña. Magdalena Gibert Perelló

2009



**FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID**

D. Víctor Briones Dieste, Profesor Titular del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense, Dña. Sonia Téllez Peña, Profesor Visitante del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense, y D. Lucas Domínguez Rodríguez, Catedrático de Sanidad Animal de la Universidad Complutense

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral que lleva por título **“Detección y caracterización de aislados de *Escherichia coli* de origen clínico y fecal en gallinas ponedoras”** ha sido realizada por la licenciada en Veterinaria Dña. Magdalena Gibert Perelló en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense bajo nuestra dirección, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense.

Y para que así conste, a efectos legales, firman y sellan el presente certificado en Madrid, a 14 de mayo de 2009.

Fdo. V. Briones

Fdo. S. Téllez

Fdo. L. Domínguez

Queda prohibido no sonreír a los problemas,
no luchar por lo que quieres,
abandonarlo todo por miedo,
no convertir en realidad tus sueños.

Queda prohibido no buscar la felicidad,
no vivir tu vida con una actitud positiva,
no pensar en que podemos ser mejores,
sentir que sin ti este mundo sería igual.

Pablo Neruda

A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

“Todo sucede por algo, lo importante es tener paciencia y saber esperar”. Parece mentira como todo tiene un inicio y un fin, y la tesis no podía ser menos.

Durante todos estos años ha habido momentos buenos y malos, fáciles y difíciles en los que no veía claro el final, y ahora que ha llegado, me emociono al poder dar las gracias de corazón a todas aquellas personas que han compartido conmigo estos cinco años de mi vida, que de un modo u otro me han aconsejado, ayudado, apoyado o simplemente acompañado para poder terminar lo que un día empecé. Hoy es un día realmente especial para mí.

Las primeras líneas de este capítulo se las dedico a lo más importante de mi vida, mi familia. Papá Gibert y Mamá Perelló, a vosotros os dedico esta Tesis, vosotros mejor que nadie sabéis lo que me ha costado llegar hasta aquí. Gracias por vuestro amor, apoyo y comprensión incondicional, día a día, pase lo que pase. Sois el mejor ejemplo a seguir, mi modelo de vida y de familia, soy lo que soy gracias a vosotros.

A mis hermanas, Marga y Loreto, que os quiero con locura. Sois las mejores hermanas del mundo, gracias por estar a mi lado siempre. Seguid los principios que nos han enseñado, es realmente satisfactorio. Lo que más me gusta del mundo es reírme con vosotras. Mil besos.

Javi, mi nueva familia. Gracias por el amor que me das, por elegirme y cuidarme, por estar a mi lado y formar parte de la que deseo sea toda mi vida. Por transmitirme la calma que necesito y por regalarme el equilibrio que deseo. Gracias por ser tú en todo momento. Te quiero.

Y por supuesto a mi perra Pepa, que ha pasado mil y una horas a mi lado. Durmiendo o jugando, en el fondo ha sido una de las mejores compañías. Gracias cuquis! Ah! y a los pájaros piñoneros.

Tras este capítulo familiar, me gustaría dar las gracias a la Universidad Complutense por concederme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral. A mis directores: Lucas Domínguez, Víctor Briones y Sonia Téllez, gracias por vuestra ayuda, habéis formado parte de mi vida durante estos años, cada uno a vuestra manera, aportando lo necesario para seguir adelante.

Lucas, me concediste la oportunidad de formar parte de tu equipo y de poder llevar a cabo esta Tesis, que en realidad era de Micoplasmosis en gallinas ponedoras y decidiste cambiar de un modo muy acertado. Gracias por tu ayuda y apoyo incondicional, por los ánimos en las cuevas arriba y demostrar día a día que eres el motor del laboratorio, por introducirme en el mundo de la avicultura y ayudarme a evolucionar como profesional. Espero que la colaboración continúe en esta nueva etapa que empieza.

Víctor, gracias de corazón por tu dedicación y atención en todo momento, siempre has estado a mi lado ayudándome a dar la mejor de las visiones a este trabajo. Tu opinión crítica y consejos han sido fundamentales para poder alcanzar esta meta, muchas gracias.

Sonia, mi Soni, que puedo decirte en un papel que no te haya dicho ya, hemos compartido tantas cosas que es muy difícil empezar a enumerarlas. Gracias por estar a mi lado, en todo y para todo.

Que sería de esta Tesis sin nombrar al “Decan”, Joaquín Goyache. Mi profesor en las prácticas de Microbiología de 2º, al que sacábamos los colores en cada clase, los carteles con mensajes por la ventana de enfrente de su antiguo despacho, mi tutor interno, pero sobre todo mi amigo. Gracias de corazón por haber estado a mi lado siempre, por tu comprensión y ayuda, por alegrarte de mis logros y sobre todo por nuestra amistad.

Gracias también a Anabel, José Garayzabal y Ana Mateos por vuestro apoyo e interés constante. Dentro de VISAVET he tenido la suerte de contar con compañeros envidiables y de haber encontrado amigos de los de verdad, de toda la vida. Gracias a todos!!! Me llevo el mejor recuerdo del mundo.

No podría empezar este pequeño repaso visavetiano sin nombrar a dos de las personas más importantes de esta etapa, Nerea y Jose Luís “el grupo de la Moñoño”, es imposible describir lo que hemos vivido los tres juntos, hemos formado un buen equipo.

Nere, no te imaginas cuantos momentos guardo en mi memoria, son incontables! Gracias por haberte conocido, por ser la mejor compañera de trabajo y amiga que se puede tener, sin ti no hubiera sido fácil terminar. Por nuestras vidas paralelas, por todas

nuestras conversaciones, canciones y bailes y por ser Piscis. Eres una persona básica y fundamental en mi vida.

Pepelu, llevamos doce años de amistad y no dejas de sorprenderme, eres una de las personas más auténticas que conozco. Gracias por ser tan positivo y transmitir tanta felicidad, siempre “palante”, echo de menos tus canciones y gritos, nuestras conversaciones y los sustos metido en la caja de cartón. Soy afortunada por haberte conocido, gracias.

Ahora te toca a ti, Pilar Liébana, mi primera jefa!! La mejor!! Quiero agradecerte de corazón todo lo que me has enseñado, tu dedicación y empeño. Macetillas, me enorgullece ser de las pocas personas con las que no has discutido en el laboratorio, gracias por los buenos momentos. Laurita de las Heras, imprescindible para reír, marujear y para levantar el ánimo. Goser, cuantos momentos piscineros y aperitocheros, eh? pocos han visto lo que tú, gracias por todo. Julio, el gabinete psicológico, gracias por las fuerzas transmitidas y por las largas conversaciones que teníamos.

A los que como yo, han volado del nido: Gema, por tu fortaleza y por esos viajes gallineros. Cebo, por ser un tío serio de los de verdad, gracias por tu compañía. Delia, Kike, Cristina, Fidel, Ruth, gracias por los buenos momentos compartidos. A las chicas ICM: Almudena, gracias por tu ayuda molecular; Ester, Bea Tames y Fátima aunque la estancia fue corta, yo creo que aprovechamos muy bien el tiempo. Bioseguridad al completo: Laura D., Laura C. y David, gracias por vuestra amistad y por los litros de BHI que hemos compartido. A las chicas “VE”: Concha, María, Isa, Carol, M^a Carmen, Tiru y la mejor de las ayudas con los cerditos, Fany!!

A Marta oveja Alcarreña de Azuqueca, gracias por ser mi “hija” durante un tiempo y por transmitir tantas ganas y entusiasmo. Marga, la mejor secretaria del mundo con más fotos del recuerdo. Bea Romero, eres una persona excelente, te deseo toda la suerte del mundo. Sabrina y Elena, gracias por vuestro ánimo, el apoyo es mutuo. Y a todos los micobacterios, gracias por vuestra compañía durante estos años. A Lucía de Juan (enhorabuena, mamá) y Alicia Aranaz por vuestro interés constante, siempre animándome a seguir adelante.

Me gustaría transmitir mi agradecimiento a toda la gente del departamento de Sanidad Animal que me han ofrecido su ayuda y compañía: Mar Blanco, Alicia Gibello, Miguel Ángel Moreno, Santa y Toño por toda su ayuda, Alvarito, Jose Antonio, Bruno,

etc. Gracias a todos! También a Manolo Pizarro por su gran ayuda y criterio en patología avícola.

Agradecer a la Dra. Lisa K. Nolan del Departamento de Microbiología Veterinaria y Medicina Preventiva, *Iowa State University, (USA)*, su ayuda y esfuerzo a la hora de remitirnos las cepas de Referencia para poner a punto las técnicas de PCR utilizadas en este estudio.

Llega el turno del mundo gallinero propiamente dicho, Cantos Blancos ahora Huevos Guillén, donde he aprendido todo lo que sé de la producción avícola, gracias Xabi por darme esta oportunidad. Un recuerdo especial para Pedro Luís, Ximo y Joaquín, Guillén todos ellos, y Andrés Colmenar, me llevo un gran recuerdo de vosotros.

Millones de gracias a mis compañeros veterinarios: Elías, sólo tengo palabras de agradecimiento para ti, gracias por tu alegría y sinceridad, me ha encantado conocerte y aprender a tu lado, contigo la risa está asegurada. Nunca olvidaré nuestras largas conversaciones; Mario, una gran persona, gracias por tu serenidad y templanza, trabajar contigo ha sido un auténtico placer; Carrasquer, a pesar de llevar un orden desordenado, eres el auténtico “friki gallinero”. Gracias por nuestras charlas eternas sobre vacunas, patología, etc. eres una máquina y llegarás muy lejos.

Y como no, gracias al CORRILLO, el motor de Cantos Blancos, la alegría de Alovera: Pichón, gracias por tu sabiduría, tus piropos y por todas esas palabrejas que me has enseñado; “Bambino” y Juan Carlos, gracias por TODA la ayuda incondicional ofrecida y por lo que me habéis enseñado, sois personas únicas; Martita, eres una dulzura, te mereces ser muy feliz, ya verás como todo sale bien; Yolanda, la alegría en estado puro, gracias por todos los momentos inolvidables; Almu, la más sentimental, vales un montón; Ana, la visión más real de la vida, eres todoterreno. Gracias a todos de corazón por los momentos que me habéis hecho vivir a vuestro lado y por vuestra preocupación continua, sin vosotros mi estancia en Guadalajara hubiera sido mucho más difícil. Lo más importante es la amistad que me llevo, nunca os olvidaré. A mi también me ha dado mucha pena irme, mucha.

También quiero dedicar este momento a personas como Julian Mancheño y Luís Oliveira, Antonio Valle, Francisco y Tere, gracias de corazón por lo que me habéis ofrecido y enseñado. A Felipe de la Mondejana (el más currante del mundo), Paco, Mauri, Ursula, Carmen, M^a Angeles, Pedro, José Manuel, María, Rafa, Bárbara, Loli,

Maite, Maribel, Santi Grande, M^a Mar, Azucena y Marisa, los Mondejanos, Paco Transmoral, Eugenio Parralero, José Luis Gaspar, y todos los demás, trabajar con vosotros ha sido un auténtico placer. A personas como Jesús Morales (Ceva), Joaquín Girón (Intervet), María Tristán (Intervet) y Julián Pantoja, por vuestro interés y ayuda incondicional, y por alegraros de mis logros. Estaremos en contacto, seguro.

Mi más sincero agradecimiento al grupo Merial (Enrique, Naranjo, Ernest y Javier) por todas las facilidades que me habéis dado, por vuestra amabilidad y por recibirme con los brazos abiertos en esta nueva etapa profesional. Gracias de corazón.

Un trocito de esta tesis pertenece a dos de las personas más especiales que conozco, Jose y Noe. Que puedo decir de vosotros que no os haya dicho ya, sois el mejor apoyo que he podido tener, en todos los aspectos de mi vida. Gracias por estar a mi lado siempre y por darme el mejor consejo, que podamos seguir celebrando como hasta ahora nuestros triunfos. Noe y David, el mejor diseño gráfico que podía imaginar, gracias!!!

A dos grandísimas amigas y compañeras de promoción, María y Tania, gracias por estar a mi lado siempre y por buscar un ratito para quedar. Ruth, Saru, Eva, Neli, gracias por todos los grandes momentos que nos hemos dedicado.

A Rafita, por preocuparte por mí siempre, aunque pase el tiempo sé que estás ahí, eso es lo importante.

A mi pequeña familia mallorquina, tan lejos pero tan presente. Un beso especial a la familia de Felanitx, después de la tormenta siempre viene la calma, ánimo y fuerzas para seguir adelante. A la tía Juana, que tanto nos quiere, a los tíos y primos de Alaró y a Cati - Caba, mil gracias por vuestra amistad infinita y disposición absoluta.

Y para finalizar, dedico esta tesis también a un grupo de personitas que nos dejó hace mucho tiempo, mis abuelos y bisabuela. Ramón y Margarita, José y Magdalena, me entristece mucho no haber podido disfrutar de vosotros, pero gracias por haberme dado unos padres que me han hecho ser como soy, estaríais orgullosos de ellos. Hoy es uno de esos días que me hubiera encantado vivir a vuestro lado y estoy segura que desde donde estéis me miráis, cuidáis y sois felices por lo que voy logrando. Os quiero.

Gracias de corazón a todos los que involuntariamente he olvidado citar y que en mayor o menor medida me han acompañado durante la realización de esta Tesis Doctoral. GRACIAS!!

Índice	pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. IMPORTANCIA DE LA AVICULTURA DE PUESTA	3
1.1.1. Situación actual en España	3
1.1.2. Importancia de las enfermedades en avicultura de puesta	3
1.1.2.1. Principales enfermedades infecciosas en avicultura de puesta	4
1.1.2.1.1. Enfermedad Respiratoria Crónica (ERC)	5
1.1.2.1.2. Coriza Infecciosa	6
1.1.2.1.3. Enfermedad de Newcastle	7
1.1.2.1.4. Bronquitis Infecciosa	9
1.1.2.1.5. Laringotraqueítis Infecciosa	10
1.1.2.1.6. Influenza aviar	11
1.1.2.1.7. Neumovirus aviar	13
1.1.2.1.8. Leucosis Linfoide	14
1.1.2.1.9. Enfermedad de Marek	14
1.1.2.1.10. Viruela aviar	15
1.1.2.1.11. Encefalomiелitis aviar	16
1.1.2.1.12. Enfermedad de Gumboro	17
1.1.2.1.13. Anemia infecciosa	19
1.1.2.1.14. Salmonelosis aviar	20
1.1.2.1.15. Cólera aviar	22
1.1.3. Colibacilosis: consideraciones generales	13
1.1.3.1. Importancia de la colibacilosis	23
1.1.3.1.1. <i>E. coli</i> enteropatógeno (ECEP)	24
1.1.3.1.2. <i>E. coli</i> enterotoxigénico (ECET)	26
1.1.3.1.3. <i>E. coli</i> enteroinvasivo (ECEI)	27
1.1.3.1.4. <i>E. coli</i> enteroagregativo (ECEA)	27
1.1.3.1.5. <i>E. coli</i> verotoxigénico (ECVT)	28
1.1.3.1.5.1. <i>E. coli</i> como agente zoonótico: importancia de los animales como reservorio de ECVT	28

	pág.
1.1.3.2. Colibacilosis aviar	31
1.1.3.2.1. Antecedentes y estado actual	31
1.1.3.2.2. Epidemiología de la colibacilosis	32
1.1.3.2.3. Sintomatología y lesiones	35
1.1.3.2.4. Diagnóstico: sistemas de identificación y caracterización de aislados de <i>E. coli</i>	39
1.1.3.2.5. Medidas preventivas y tratamiento	47
1.1.3.2.6. Mecanismos patogénicos: principales factores de virulencia en los aislados de <i>E. coli</i> aviaries	50
1.1.3.2.6.1. Factores implicados en la capacidad adhesiva.	52
1.1.3.2.6.2. Factores implicados es los sistemas de captación y liberación de hierro	53
1.1.3.2.6.3. Factores implicados en la supervivencia aumentada en el suero	54
1.1.3.2.6.4. Producción de colicinas	55
1.1.3.2.6.5. Actividad hemaglutinante termosensible	55
2. OBJETIVOS	57
3. MATERIAL Y MÉTODOS	61
3.1. PROTOCOLO DE AISLAMIENTO	63
3.1.1. Muestras estudiadas	63
3.1.1.1. Condiciones de muestreo	63
3.1.1.2. Toma de muestras	65
3.1.1.3. Muestras procesadas	67
3.1.2. Procesamiento de las muestras	68
3.1.2.1. Muestras clínicas	68
3.1.2.2. Muestras fecales	70
3.1.2.3. Criterios para la selección de colonias	71
3.1.2.4. Conservación de los aislados obtenidos	72
3.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS	73
3.2.1. Identificación bioquímica	73

	pág.
3.2.2. Determinación del antígeno somático	74
3.2.2.1. Materiales	74
3.2.2.2. Procedimiento para la realización de la aglutinación en microplaca	76
3.3. DETECCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA	77
3.3.1. Extracción del ADN cromosómico	78
3.3.2. Elección de los oligonucleótidos	78
3.3.3. Reacción de PCR	80
3.4. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO (PFGE)	83
3.4.1. Principio de la técnica	83
3.4.2. Materiales	84
3.4.3. Preparación de los bloques	85
3.4.4. Lisis bacteriana	86
3.4.5. Restricción enzimática para <i>E. coli</i>	87
3.4.6. Separación de los fragmentos de ADN: condiciones para la electroforesis	88
3.4.7. Interpretación de los resultados de PFGE: análisis informático y estadístico	90
3.5. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	90
3.6. ANÁLISIS INFORMÁTICO Y ESTADÍSTICO	92
 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 93
4.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN	95
4.1.1. Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> a partir de muestras clínicas	95
4.1.2. Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> a partir de muestras fecales	99
4.2. ANÁLISIS DE LA DETECCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA: PATOTIPOS	99
4.2.1. Muestras de origen clínico	99
4.2.1.1. Análisis de los factores de virulencia estudiados	102
4.2.1.2. Cuantificación de la detección de factores de virulencia	106
4.2.1.3. Correlaciones entre los factores de virulencia detectados	108
4.2.2. Muestras de origen fecal	110

	pág.
4.2.2.1. Análisis de los factores de virulencia estudiados	111
4.2.2.2. Cuantificación de la detección de factores de virulencia	114
4.2.2.3. Correlaciones entre los factores de virulencia detectados	116
4.2.3. Comparación entre la detección de factores de virulencia en aislados clínicos y fecales	117
4.3. DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO SOMÁTICO: SEROGRUPOS	119
4.3.1. Correlación entre el serogrupo y los factores de virulencia detectados en los aislados clínicos	122
4.4. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO (PFGE): PULSOTIPOS	126
4.4.1. Estudio mediante <i>Pulsed field gel electrophoresis</i> (PFGE) de los aislados clínicos	126
4.4.1.1. Asociación entre los perfiles de restricción obtenidos con el serogrupo y el patotipo	129
4.4.2. Estudio mediante <i>Pulsed field gel electrophoresis</i> (PFGE) de los aislados fecales	133
4.4.3. Estudio de los brotes de colibacilosis mediante las técnicas de PCR, serotipado y PFGE	135
4.5. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	139
5. CONCLUSIONES	141
6. RESUMEN	147
7. SUMMARY	151
8. BIBLIOGRAFÍA	155

Índice de Tablas	pág.
Tabla 1 Factores predisponentes para el desarrollo de una infección por <i>E. coli</i>	33
Tabla 2 Principales grupos de genes de virulencia en APEC	51
Tabla 3 Relación del número de muestras clínicas analizadas	67
Tabla 4 Relación del número de muestras fecales analizadas	68
Tabla 5 Relación de sueros utilizados en la determinación del antígeno somático	75
Tabla 6 Oligonucleótidos empleados en la PCR múltiple	79
Tabla 7 Oligonucleótidos empleados en la determinación del factor <i>fimC</i> por PCR	79
Tabla 8 Oligonucleótidos empleados en la determinación del factor <i>fyuA</i> por PCR	79
Tabla 9 Relación de cepas de <i>E. coli</i> empleadas como control positivo	80
Tabla 10 Relación de tampones utilizados en la electroforesis de campo pulsado	84
Tabla 11 Composición de la mezcla o <i>mix</i> para la predigestión enzimática	87
Tabla 12 Composición de la mezcla o <i>mix</i> para la realización de la digestión enzimática	88
Tabla 13 Parámetros de electroforesis para la enzima <i>XbaI</i>	89
Tabla 14 Características del antimicrobiano estudiado <i>in vitro</i>	91
Tabla 15 Distribución de los aislados de <i>E. coli</i> según los órganos y lesiones procesadas	95
Tabla 16 Representación de los patotipos obtenidos y el número de aislados clínicos de <i>E. coli</i> incluidos en cada uno de ellos	100
Tabla 17 Porcentaje de detección de cada factor de virulencia en aislados de origen clínico	102
Tabla 18 Distribución de los aislados clínicos de <i>E. coli</i> según el número de factores detectados	107
Tabla 19 Distribución de los aislados clínicos de <i>E. coli</i> según las combinaciones de factores obtenidas	109
Tabla 20 Representación de los patotipos obtenidos y el número de aislados fecales de <i>E. coli</i> incluidos en cada uno de ellos	111
Tabla 21 Porcentaje de detección de cada factor de virulencia en aislados de origen fecal	112
Tabla 22 Distribución de los aislados fecales de <i>E. coli</i> según el número de factores detectados	116
Tabla 23 Distribución de aislados fecales de <i>E. coli</i> según las combinaciones de factores obtenidas	117
Tabla 24 Comparación estadística entre los porcentajes de detección de cada factor de virulencia dependiendo de su origen (fecal o clínico)	118
Tabla 25 Distribución de los aislados clínicos de <i>E. coli</i> según los serogrupos obtenidos	120

Índice de Tablas	pág.
Tabla 26 Correlación entre serogrupos y patotipos en los aislados clínicos de <i>E. coli</i>	123
Tabla 27 Resultados obtenidos mediante PFGE en aislados clínicos	126
Tabla 28 Distribución de los aislados clínicos en función de los pulsotipos y serogrupos obtenidos	130
Tabla 29 Distribución de los aislados clínicos en función de los pulsotipos y patotipos obtenidos	132
Tabla 30 Resultados obtenidos mediante PFGE en aislados fecales	133
Tabla 31 Detalle de las características de los brotes de colibacilosis estudiados (I)	136
Tabla 32 Detalle de las características de los brotes de colibacilosis estudiados (II)	137
Tabla 33 Detalle de las características de los brotes de colibacilosis estudiados (III)	138

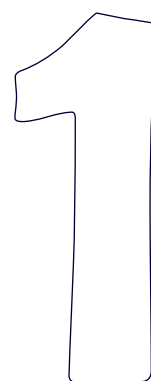
Índice de Figuras	pág.
Figura 1 Distribución del censo de gallinas ponedoras en España	3
Figura 2 Esquema de los mecanismos que dan lugar a la lesión de adhesión y borrado	25
Figura 3 Perihepatitis y pericarditis fibrinosa por <i>E. coli</i>	36
Figura 4 Peritonitis fibrinosa debida a una infección por <i>E. coli</i>	36
Figura 5 Inflamación y congestión hemorrágica del ovario y oviducto por <i>E. coli</i>	37
Figura 6 Salpingitis y peritonitis fibrinosa en gallina ponedora por <i>E. coli</i>	38
Figura 7 Galería multisustrato para la identificación bioquímica de <i>E. coli</i>	41
Figura 8 Principales antígenos de superficie (O, K, H y F) en <i>E. coli</i>	44
Figura 9 Prueba de sensibilidad bacteriana mediante el método de difusión en ágar	46
Figura 10 Cuestionario utilizado en la recogida de muestras	64
Figura 11 Protocolo de aislamiento microbiológico de <i>E. coli</i> a partir de las muestras analizadas	69
Figura 12 Morfología de colonias lactosa positivas en medio sólido Ágar McConkey	72
Figura 13 Microplaca utilizada en la determinación del antígeno somático	76
Figura 14 Representación de la distribución de los aislados en función del órgano	96
Figura 15 Lesiones de peritonitis en una gallina ponedora	97
Figura 16 Representación del éxito de aislamiento en función del órgano	98
Figura 17 Gel de PCR (<i>fimC</i>)	101
Figura 18 Gel de PCR (<i>fyuA</i>)	101
Figura 19 Gel de PCR (múltiple)	102
Figura 20 Representación del grupo mayoritario por patotipos en aislados clínicos	106
Figura 21 Representación del grupo mayoritario por patotipos en aislados fecales	115
Figura 22 Gel de PFGE: representación de los distintos patrones de bandas en aislados clínicos	127
Figura 23 Representación de los perfiles de restricción obtenidos en aislados clínicos por PFGE	128
Figura 24 Representación de los perfiles de restricción obtenidos en aislados fecales por PFGE	134

Índice de Abreviaturas

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
APEC	<i>Avian pathogenic E. coli</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C	Citosina
°C	Grados centígrados
CH	Colitis Hemorrágica
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
cm	Centímetro
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DHI	Diámetro del Halo de Inhibición
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
ERC	Enfermedad Respiratoria Crónica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ECEA	<i>E. coli</i> enteroagregativo
ECEI	<i>E. coli</i> enteroinvasivo
ECEP	<i>E. coli</i> enteropatogénico
ECET	<i>E. coli</i> enterotoxigénico
ECVT	<i>E. coli</i> verotoxigénico
F	Antígeno fimbrial
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	Guanina
g	Gramo
H	Antígeno flagelar
h	Hora
IA	Influenza Aviar
IAAP	Influenza Aviar de Alta Patogenicidad
IABP	Influenza Aviar de Baja Patogenicidad
IMVIC	Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer y Citrato
ITU	Infección Tracto Urinario
K	Antígeno capsular
Kb	Kilobases
L	Litro
LB	Luria Bertani
LT	Termolábil
LTI	Laringotraqueítis Infecciosa
N	Neuraminidasa
ND	No determinado

Índice de Abreviaturas

NCCLS	<i>National Comitée for Clinical Laboratory Standards</i>
NT	No Tipable
Mb	Megabase
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
O	Antígeno somático
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
pb	Pares de bases
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
pmol	Picomol
PTT	Púrpura trombocitopénica trombótica
RD	Real Decreto
REDP	<i>RestrictionEnzyme Digestion Profile</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RT-PCR	Reverse transcriptase-PCR
s	Segundo
SSI	<i>Statens Serum Institute</i>
ST	Termosensible
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
T	Timina
TRT	Rinotraqueítis del pavo
UE	Unión Europea
V	Voltio
VT	Verotoxina
µl	Micrólitro
µM	Micromolar



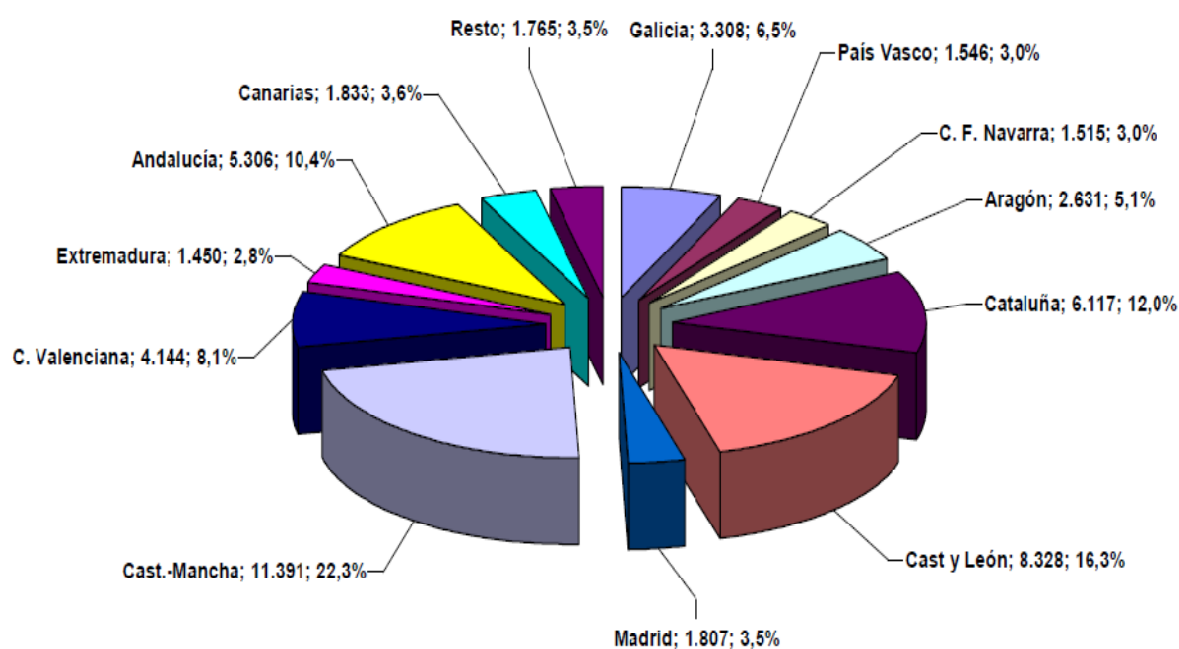
INTRODUCCIÓN

1.1. IMPORTANCIA DE LA AVICULTURA DE PUESTA

1.1.1. Situación actual en España

Según Inprovo (www.inprovo.com), en 2008, el censo de gallinas ponedoras en España superó los 40 millones. Las Comunidades Autónomas donde se concentran los mayores censos de gallinas ponedoras son Cataluña, Castilla La Mancha y Castilla León. En la Figura 1, se representa la distribución regional del censo total de gallinas ponedoras por Comunidades Autónomas.

Figura 1. Distribución del censo de gallinas ponedoras en España (miles de aves, año 2005) (Fuente: marm, 2008)



1.1.2. Importancia de las enfermedades en avicultura de puesta

Las enfermedades que afectan al sector avícola de puesta tienen gran influencia sobre los parámetros productivos o zootécnicos, y en algunos casos en Salud Pública.

Suponen importantes pérdidas económicas por la mortalidad animal, los retrasos del crecimiento, el coste de los tratamientos veterinarios, así como, los debidos a descensos en la producción por disminuciones del porcentaje de puesta o por alteraciones en la calidad del huevo, siendo no aptos para su comercialización. Los gastos derivados del control de estas enfermedades suponen una gran inversión para la industria avícola de puesta.

El origen para el desarrollo de las enfermedades es muy variado: manejo, genético, nutricional, bacteriano, vírico, parasitario, fúngico, etc. Cualquier causa que origine estrés puede desencadenar la aparición de una enfermedad, ya que el sistema inmune del animal se encuentra comprometido (Dho-Moulin, 1993; Gross, 1994; Buxadé *et al.*, 2000).

Hay enfermedades que no tienen relación directa con la disminución o alteración de parámetros productivos, pero actúan como factores predisponentes para el desarrollo de otras enfermedades que pueden influir a este nivel.

Por todo ello, pasamos a detallar las principales características de las enfermedades más importantes en avicultura de puesta.

1.1.2.1. Principales enfermedades infecciosas en avicultura de puesta

El presente estudio se centra únicamente en gallinas ponedoras alojadas en jaula. La relación de enfermedades expuestas en este trabajo se limita a las de etiología vírica y bacteriana, por ser las más frecuentes. Es importante resaltar que las enfermedades causadas por hongos y levaduras, por toxicidad, enfermedades del metabolismo y de la nutrición, presentan una incidencia relativamente baja.

Lo mismo sucede con las enfermedades parasitarias; no son tan relevantes como en el caso de sistemas de producción cárnica o sistemas alternativos. Sin embargo, es importante destacar la coccidiosis por las alteraciones significativas en los parámetros productivos, por su papel como precursora de otros procesos digestivos y por la mortalidad que puede ocasionar (Buxadé, 2000).

También es importante otra enfermedad parasitaria externa causada por el ácaro *Dermanyssus gallinae* (*D. gallinae*) o ácaro rojo de la gallina. Sus hábitos son nocturnos y

acuden a las gallinas atraídos por el calor corporal, alimentándose de sangre. Esto provoca un estado de debilidad y estrés muy elevado para los animales aumentando la susceptibilidad a otras enfermedades, así como drásticas disminuciones del bienestar animal (De Luna *et al.*, 2008). También se ha demostrado su papel como vector transmisor de enfermedades víricas y bacterianas (Valiente *et al.*, 2005, 2007a, 2007b; De Luna *et al.*, 2008).

D. gallinae es responsable de importantes pérdidas económicas en el sector, debidas tanto a la mortalidad como a la disminución en la comercialización de los huevos, que presentan manchas de sangre (Buxadé, 2000).

1.1.2.1.1. Enfermedad Respiratoria Crónica (ERC)

Mycoplasma gallisepticum (*M. gallisepticum*) es el agente principal de la ERC y junto con *M. gallinarum*, *M. pullorum*, *M. gallinaceum* y *M. iners* son los más frecuentemente aislados en granjas avícolas (Poveda *et al.*, 1990). El proceso se inicia frecuentemente con una infección primaria como Enfermedad de Newcastle o Bronquitis Infecciosa, y el cuadro suele agravarse debido a una invasión bacteriana secundaria, normalmente con *Escherichia coli* (*E. coli*) (Breé *et al.*, 1989; Nakamura *et al.*, 1992a; Barnes *et al.*, 2003; Ley, 2003).

La infección puede transmitirse vía vertical, en la cual las reproductoras infectadas transmiten *M. gallisepticum* a su descendencia a través del huevo (Ley, 2003; Bencina *et al.*, 2005). A pesar de la baja persistencia de los micoplasmas en el medio ambiente (Christensen *et al.*, 1994) se ha descrito su transmisión horizontal a través del aire, polvo, gotas de la expectoración, materiales, personal, etc. Los pájaros, roedores e insectos también pueden actuar como reservorio de la enfermedad (Poveda *et al.*, 1990; Christensen *et al.*, 1994; Ley, 2003; Dhondt *et al.*, 2007).

El periodo de incubación oscila desde 4 días a 3 semanas. Las aves jóvenes muestran dificultad respiratoria, anorexia, disminución de ganancia de peso e incremento de los índices de conversión del pienso. En las aves adultas, la sintomatología más frecuente es respiratoria: estornudos, tos y congestión generalizada de vías respiratorias, tráquea congestiva e inflamada con aumento de la mucosidad y/o exudado caseoso en los sacos aéreos, especialmente en infecciones secundarias por *E. coli*. Se puede observar también

conjuntivitis, sinovitis e inflamación y congestión a nivel del aparato reproductor, pudiendo alterar la producción de huevos (Ley, 2003) lo que supondría importantes pérdidas económicas. Dependiendo de la gravedad del brote, la morbilidad suele ser alta (80-100%) y la mortalidad oscila entre el 5 y el 20%. En caso de contaminación por otros microorganismos el porcentaje de mortalidad puede ser superior.

Puede realizarse el aislamiento por cultivo (Marois *et al.*, 2000) a partir de muestras clínicas, aunque resulta una técnica compleja, y también mediante la detección de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* por PCR (Kempf *et al.*, 1993; Marois *et al.*, 2000, 2002; Mekkers *et al.*, 2005). El diagnóstico diferencial se debe realizar con Enfermedad de Newcastle o Bronquitis Infecciosa combinada con infección secundaria por *E. coli* u otros microorganismos (Kleven, 1998). Chirinos *et al.*, (2000) sugieren en su estudio la utilización de técnicas ELISA como prueba serológica para determinar anticuerpos contra *M. gallisepticum* y *M. synoviae* y la PCR como prueba confirmatoria para el diagnóstico de micoplasmosis aviar.

Las medidas de bioseguridad, junto con buenas pautas de manejo (instalaciones adecuadas, programas de ventilación, limpieza, apropiada densidad de animales, etc.) son los elementos más importantes para evitar la contaminación por *M. gallisepticum* y *M. synoviae*.

La única vacuna autorizada en España es Nobilis MG 6/85 (Intervet-Schering-Plough Animal Health). Es una vacuna viva liofilizada que se administra por vía inhalatoria (spray fino). En los análisis serológicos, los títulos de anticuerpos en lotes vacunados indican contacto con *M. gallisepticum*, no revelan presencia de enfermedad.

1.1.2.1.2. Coriza Infecciosa

El agente etiológico es *Haemophilus paragallinarum* (*H. paragallinarum*), bacteria que puede transmitirse por el aire a través de partículas de polvo o por el agua de bebida y también a través del personal, animales vectores o materiales de la granja (Blackall y Matsumoto, 2003). El periodo de incubación varía de 1 a 3 días.

Se trata de una enfermedad que afecta al tracto respiratorio superior de las aves observando inflamación óculo-nasal con supuración, conjuntivitis, estornudos e inflamación facial (Blackall y Matsumoto, 2003; García *et al.*, 2008). La incidencia de la

enfermedad es mayor en los complejos multiedad aunque también depende de la situación geográfica y la época del año. Se producen importantes pérdidas económicas debidas a las escasas ganancias de peso y a la disminución del porcentaje de puesta (10-40%). La morbilidad es elevada y la mortalidad generalmente es baja pero depende de la virulencia de la infección.

Los síntomas son similares a los producidos en la Micoplasmosis, por lo que el diagnóstico presuntivo es difícil de establecer. El diagnóstico definitivo se obtiene mediante el aislamiento de la bacteria a partir del exudado, de los senos o de los sacos aéreos de las aves afectadas. Existen técnicas moleculares de PCR para la determinación de *H. paragallinarum* (Chen *et al.*, 1998) y de ribotipado (Mifflin *et al.*, 1997).

Se pueden realizar tratamientos con antibióticos, pero la erradicación y la prevención son los medios de control más recomendables. Los programas de vacunación mediante autovacunas inactivadas se centran en áreas donde la enfermedad es endémica y no puede ser erradicada.

1.1.2.1.3. Enfermedad de Newcastle

Se trata de una enfermedad de declaración obligatoria urgente en todos los países de la Unión Europea (UE), listada en el anexo I del Real Decreto (RD) 617/2007, en el cual se establece la lista de enfermedades animales de declaración obligatoria y se regula su notificación. Está causada por un virus de la familia *Paramyxoviridae* perteneciente al serotipo 1.

La gravedad de la enfermedad depende de la virulencia de la cepa responsable (lentogénicas, mesogénicas y velogénicas), del tipo de hospedador, edad, estado inmunitario, otras infecciones, condiciones medioambientales y vía de transmisión. Ésta puede ser por las secreciones de las aves infectadas, especialmente las heces (Alexander, 2003), material infectado, camiones, personal, animales salvajes y a través del aire. El periodo de incubación es variable, oscilando entre 2 y 15 días.

Las aves salvajes, sobre todo las palomas, son una importante fuente de infección para las granjas avícolas, ya que pueden eliminar virus a través de las heces (Alexander *et al.*, 1997; Gohm *et al.*, 2000).

Las cepas velogénicas dan lugar a formas clínicas sobreagudas, la morbilidad puede llegar a alcanzar valores del 100% y la mortalidad puede superar el 50% en aves adultas y el 90% en aves jóvenes. El cuadro clínico es de corta duración, aparece bruscamente y se propaga con rapidez. La sintomatología es respiratoria y nerviosa (Buxadé, 2000).

Las cepas mesogénicas dan lugar a formas clínicas agudas, cursando con sintomatología respiratoria y las alteraciones nerviosas no son frecuentes (Alexander, 2003). Se produce una caída brusca de la puesta que puede persistir durante semanas, con afectación de la calidad de la cáscara. Las cepas lentogénicas no suelen cursar con problemas en aves adultas, sin embargo, en las jóvenes provocan un cuadro respiratorio leve acompañado de cierta mortalidad (Alexander, 2003). La caída de puesta originada, se recupera en pocas semanas sin alcanzar los valores iniciales (Buxadé, 2000).

Para llevar a cabo el diagnóstico definitivo se debe realizar el aislamiento e identificación del virus a partir de hisopos de la tráquea o de la cloaca mediante la inoculación de huevos embrionados de pollo, así como la evaluación de la patogenicidad. También pueden emplearse técnicas serológicas como el ELISA, la prueba de la inhibición de la hemaglutinación, etc.

El diagnóstico diferencial podría realizarse con Bronquitis Infecciosa, Cólera, Influenza Aviar, Micoplasmosis o Laringotraqueítis Infecciosa.

Como sucede con las demás enfermedades víricas, no existe tratamiento específico. Puede recurrirse al empleo de antibióticos de amplio espectro autorizados para evitar posibles infecciones secundarias. Por ello, lo más eficaz para luchar contra la enfermedad de Newcastle es la profilaxis (Buxadé, 2000).

Se pueden utilizar vacunas preparadas con cepas vivas, aplicadas bien por vía aerógena-nebulización o en agua de bebida, y vacunas inactivadas de aplicación intramuscular (Alexander, 2003).

Las vacunas disponibles actualmente en el mercado son las siguientes: Nobilis C-30 (Intervet-Schering-Plough Animal Health), Poulvac NDW (Fort Dodge), Hipraviar B1, Hipraviar clon, Hipraviar S viva cepa la sota (Hipra) y TAD-ND vac la sota (Calier).

1.1.2.1.4. Bronquitis Infecciosa

Enfermedad vírica de curso agudo, cuyo agente etiológico pertenece a la familia *Coronaviridae*. Es altamente contagiosa a través del aire, pudiéndose transmitir incluso entre granjas (Cavanagh, 2003).

La infección se caracteriza por alteraciones respiratorias (tráqueas congestivas con exceso de mucosidad incluso en los sacos aéreos; en animales jóvenes la aparición de un tapón caseoso amarillento en la bifurcación de la tráquea es indicativa de este tipo de enfermedad), alteraciones renales y descenso de la producción con alteraciones de la calidad de la cáscara, lo que origina importantes pérdidas económicas (Cavanagh y Naqi, 2003; Liu *et al.*, 2006). En las pollitas jóvenes el virus afecta también al tracto genital en formación, provocando lesiones irreversibles y dando lugar a futuras “falsas ponedoras”. Esta enfermedad aumenta la susceptibilidad a infecciones secundarias como las producidas por *E. coli* (Matthijs *et al.*, 2005).

Para realizar el diagnóstico hay tres factores a tener en cuenta: la valoración de las lesiones, el aislamiento del virus en el laboratorio y el incremento de los títulos de anticuerpos en muestras de suero.

No existe tratamiento, y la vacunación preventiva de todos los lotes mediante vacunas vivas (administradas en las 5 primeras semanas de vida y en el agua de bebida) e inactivadas (en combinación con otros antígenos alrededor de la decimotercera-decimoquinta semana de vida) forma parte importante en la estrategia de control de esta enfermedad (Cavanagh, 2003).

Las vacunas disponibles actualmente en el mercado son las siguientes: Nobilis H120, Nobilis Ma5, Nobilis 4/91, Nobilis Ma5+C30 (vacuna combinada de bronquitis y peste aviar) (Intervet-Schering-Plough Animal Health), Poulvac IB H120, Poulvac IB Primer (Fort Dodge), Bronhipra-1 y Bronhipra-2 (Hipra), Avinew (Merial) y TAD- IB VAC H120 (Calier).

1.1.2.1.5. Laringotraqueitis Infecciosa (LTI)

Enfermedad respiratoria aguda (Kirkpatrick *et al.*, 2006) causada por un virus perteneciente a la familia *Herpesviridae*. La transmisión es horizontal vía respiratoria, gracias al transporte del virus a través de vectores como material de la granja, personal visitante, ropa, camiones, etc. (Guy *et al.*, 2003).

El periodo de incubación oscila entre los 4 y 12 días, la morbilidad es muy elevada (90-100%) y la mortalidad variable pudiendo incluso alcanzar el 70%, aunque lo más frecuente son valores del 10- 20%.

El virus de la LTI se replica activamente en el epitelio de laringe y tráquea (Bagust *et al.*, 1995), incluso en conjuntiva, sacos aéreos y pulmones. Los virus provocan un gran daño en el epitelio, mayoritariamente el de la tráquea, así como hemorragias. El virus está presente en las secreciones traqueales durante la primera semana post-infección, y ocasionalmente se han detectado niveles bajos de replicación del virus hasta 10 días post-infección (Bagust *et al.*, 1995).

Las aves afectadas muestran una disnea muy marcada con estertores y toses debido a la presencia de sangre, costras e incluso exudado caseoso que obstruye la laringe o la tráquea. Las aves mueren frecuentemente por asfixia (Guy *et al.*, 2003). En los últimos años han aparecido formas más suaves de la infección, observándose hipersecreción lacrimal, edema de senos infraorbitarios, rinorrea, conjuntivitis hemorrágica y una pequeña caída de puesta, con una mortalidad casi despreciable. En ponedoras la producción de huevos puede disminuir entre el 10-50%, recuperándose posteriormente los valores normales (Guy y Bagust, 2003).

El diagnóstico definitivo se realiza mediante exámenes histológicos de cortes de tráquea en los que la presencia de cuerpos de inclusión es de gran valor diagnóstico. También puede realizarse el aislamiento del virus en huevos fértiles de pollo a partir de mucosidad traqueal, ya que otras enfermedades de tipo respiratorio pueden causar la misma sintomatología y lesiones. Existen técnicas moleculares de PCR para el diagnóstico del virus (Abbas *et al.*, 1996).

La vacunación es una parte muy importante en los programas de control de la enfermedad. Actualmente sólo se elaboran vacunas vivas obtenidas por pases del virus

en embrión de pollo, algunas de las vacunas disponibles son Poulvac ILT (Fort Dodge), Nobilis ILT (Intervet-Schering-Plough Animal Health) e Hipraviar ILT (Hipra).

En comparación con las vacunas de tejido celular, que son menos problemáticas en cuanto a la reversión a la virulencia (Guy *et al.*, 1991), las obtenidas a partir de embrión de pollo son menos inocuas, pudiendo provocar un incremento en la virulencia (Kotiw *et al.*, 1995), ocasionando una reacción postvacunal mayor (conjuntivitis a los 5-7 días), aunque confieren una mayor inmunidad y más duradera. Algunas aves recuperadas de la infección pueden actuar como portadores latentes y excretar el virus durante un largo periodo de tiempo. El virus se localiza en el ganglio trigémino a los 4-7 días post-infección y su reactivación ha sido demostrada incluso a los 15 meses de la vacunación.

El programa de vacunación más habitual suele ser la aplicación de una única dosis a las 10 semanas de vida por vía ocular, aunque también puede administrarse en agua de bebida o por nebulización.

La realización de análisis serológicos nos facilita información sobre la respuesta a la vacunación del lote, aunque no existe una relación directa entre el título de anticuerpos y la protección ya que ésta es de base celular. Los anticuerpos pueden ser detectados entre los 5 y 7 días post vacunación, alcanzando un pico máximo a los 21 días.

1.1.2.1.6. Influenza Aviar (IA)

La Influenza aviar es una enfermedad infecciosa vírica altamente contagiosa de las aves de corral y otras aves cautivas, causada por un virus de la familia *Orthomyxoviridae*, género *Influenzavirus A*. Se trata de una enfermedad de Declaración Obligatoria, listada en el anexo I del RD 617/2007, en el cual se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

Las medidas específicas de lucha contra la enfermedad están reguladas en nuestro país principalmente por el RD 445/2007, de 3 de abril, por el que se establecen las medidas de lucha contra la IA, y la Orden 2442/2006, de 17 de julio, por la que se establecen medidas específicas de protección en relación con la IA; la Decisión 437/2006/UE, de 4 de agosto, por el que se aprueba un manual de diagnóstico de la gripe aviar; la Decisión 415/2006/UE, sobre medidas de protección en caso de detección

de gripe aviar en aves de corral; y la decisión 563/2006/UE sobre medidas en caso de detección en aves silvestres.

Estos virus son altamente contagiosos entre las aves y se transmiten rápidamente entre granjas por los movimientos de aves domésticas vivas, animales, personas y vehículos (Swayne *et al.*, 2003).

Los virus de la IA se clasifican según la presencia de los antígenos Hemaglutinina y Neuraminidasa, existiendo multitud de posibles combinaciones. En el Anexo I del RD 445/2007, en función del grado de virulencia se definen: IA de alta patogenicidad (IAAP) como virus pertenecientes a los subtipos hemaglutinina tipo 5 ó tipo 7; o cuyo índice de patogenicidad intravenosa es mayor a 1,2 en pollos de 6 semanas de edad; y la IA de baja patogenicidad (IABP) como virus pertenecientes a los subtipos hemaglutinina tipo 5 ó tipo 7, que no entran en la definición del apartado anterior.

Los signos clínicos varían en función del serotipo de virus involucrado en la infección. En la IABP, se observa una leve sintomatología respiratoria, plumaje erizado y reducción de la producción de huevos. Puede producirse una complicación por patógenos secundarios, aumentando por tanto la gravedad del cuadro (Capua *et al.*, 2004).

En la IAAP, el virus invade además otros órganos y tejidos pudiendo observar hemorragias internas masivas, elevada mortalidad (hasta del 100%), postración, caída repentina de la producción de huevos, alteraciones de la cáscara, signos nerviosos y entéricos (Capua *et al.*, 2000; 2004).

El diagnóstico se realiza gracias a técnicas de RT-PCR a partir de muestras de origen respiratorio y fecal. El diagnóstico diferencial se realiza con Cólera Aviar agudo, con la forma velogénica de la Enfermedad de Newcastle y otras enfermedades respiratorias como la LTI.

En el Capítulo VIII del RD 445/2007 se establece la prohibición en cuanto a la vacunación de las aves domésticas, así como los planes de vacunación en caso de riesgo grave.

1.1.2.1.7. Neumovirosis Aviar

Las enfermedades producidas por neumovirus aviares pueden denominarse rinotraqueitis del pavo (TRT), síndrome de cabeza hinchada y rinotraqueitis aviar. Están causadas por un *Pneumovirus*, se transmite por el agua contaminada, personal y equipo, así como de ave a ave (Gough, 2003).

Se puede observar tos, ruidos respiratorios, descargas nasales, conjuntivitis e hinchazón del seno infraorbitario y edema submandibular. En los lotes de puesta puede producirse una caída en la producción del 70%, así como alteraciones en la calidad del huevo. La morbilidad es elevada mientras que la mortalidad puede variar entre el 0,4% y 50% (Gough, 2003). Si no se producen complicaciones bacterianas las aves se recuperan en 10-14 días.

El aislamiento del virus es muy difícil ya que desaparece muy rápido del ave, se puede realizar la detección del virus mediante PCR y otras técnicas moleculares. La detección de anticuerpos se realiza mayoritariamente por la técnica de ELISA.

No existe un tratamiento eficaz contra la enfermedad, aunque se pueden controlar las infecciones concomitantes y mejorar las condiciones ambientales, con el objetivo de disminuir la gravedad de las manifestaciones clínicas.

Gracias a los programas de vacunación se intentan satisfacer dos objetivos: proteger frente a la enfermedad y mejorar la calidad de la cáscara. La combinación de vacunas vivas administradas por nebulización junto con inactivadas administradas intramuscularmente antes del traslado a las naves de puesta, parece ser la mejor opción para el control de la enfermedad.

Las vacunas disponibles actualmente en el mercado son las siguientes: Nobilis TRT viva, TRT+IB+IBD+ND inactivada, TRT+IB+ND+EDS inactivada (Intervet-Shering Plough Animal Health), Poulvac TRT REO, inactivada (Fort Dodge), Hipraviar SHS viva, Hipraviar TRT inactivada, Hipraviar TRT4 [TRT+IB+IBD+ND] (Hipra) y Aviffa RTI viva, Gallimune 303 [ND+IB+TRT], Gallimune 407 [ND+IB+EDS+TRT] (Merial).

1.1.2.1.8. Leucosis Linfoide

La Leucosis Linfoide está causada por un virus de la familia *Retroviridae* y puede transmitirse vertical y horizontalmente (Fadly *et al.*, 2003). La principal característica de esta enfermedad es la presencia de neoplasias en la bolsa de Fabricio con metástasis en multitud de órganos internos, sobre todo en el hígado, bazo y riñón (Fenton *et al.*, 2005). Las pérdidas económicas debidas a la mortalidad por los tumores, así como por la reducción de los parámetros productivos son muy importantes (Fadly, 2000). Suele afectar a aves de más de 24 semanas de edad.

Las aves están decaídas, pálidas y con bajo peso. El diagnóstico diferencial debe establecerse con la Enfermedad de Marek, por la presencia de tumores, aunque en la Leucosis Linfoide no se producen parálisis o paresias, la incidencia es inferior al 5% y no hay hipertrofia de los nervios.

No existe tratamiento. Debido a la elevada importancia de la transmisión vertical y a que la enfermedad no es muy contagiosa, la erradicación es el mejor método de control, por tanto los esfuerzos deben concentrarse en la detección de las reproductoras infectadas, y por lo tanto portadoras y transmisoras de virus a la descendencia (Fadly, 2000).

1.1.2.1.9. Enfermedad de Marek

Es una enfermedad linfoproliferativa producida por un virus altamente contagioso de la familia *Herpesviridae* (Venugopal, 2000; Nair, 2005). El virus permanece durante mucho tiempo en el medio ambiente, afectando a aves entre 12 y 24 semanas de edad.

Las aves infectadas eliminan virus a través de los folículos de las plumas, fuente de infección para otras aves, que los inhalan. Algunas aves recuperadas de la infección pueden actuar como portadoras latentes.

La morbilidad y mortalidad son altamente variables, pudiendo observar valores de mortalidad entre un 5-50%, dependiendo de la virulencia del virus.

Los signos clínicos principales son nerviosos, de aparición temprana y se deben a una parálisis unilateral (Witter *et al.*, 2003). En otras ocasiones se puede observar el

“buche pendulante” (afectación del nervio vago), aunque lo más frecuente es una presentación aguda de la enfermedad con presencia de múltiples tumores en órganos internos (Nair, 2005). Otros signos no específicos, como pérdida de peso, palidez, anorexia y diarrea se pueden observar si el proceso es crónico. También puede existir ceguera asociada a la infiltración linfoidea del iris, que puede ser uni o bilateral (Witter *et al.*, 2003).

El diagnóstico definitivo debe realizarse laboratorialmente. El historial, la edad de las aves y la localización de las lesiones pueden servir como indicativos de la enfermedad. El diagnóstico diferencial entre Marek y Leucosis Linfoide requiere un estudio histológico para valorar lesiones a nivel microscópico como la infiltración de nervios periféricos, lesiones en bazo, bolsa de Fabricio, etc.

El nivel de protección mediante vacunación no se alcanza hasta pasados 5-7 días postinoculación por lo que es fundamental impedir contaminaciones tempranas por el virus en la granja. Por este motivo, el mejor método de control se consigue combinando la vacunación en la incubadora con la implantación de estrictas medidas de bioseguridad.

Las vacunas disponibles actualmente en el mercado son las siguientes: Nobilis Marexine CA 126 (HVT), Rismavac (Rispen), Rismavac + Marexine CA 126 (Intervet-Shering Plough Animal Health), Poulvac Marek CDI, Poulvac Marek HVT WET, Poulvac Marek CVI+HVT (Fort Dodge) y Bio Marek R+HVT, CrioMarek HVT, CrioMarek Rispen (Merial).

1.1.2.1.10. Viruela Aviar

Enfermedad causada por un virus del género *Avipoxvirus*, familia *Poxviridae*, de transmisión horizontal por contacto directo entre aves enfermas, o con agua o pienso contaminado. Se ha demostrado que los mosquitos y otros vectores como *D. gallinae* pueden ser transmisores del virus (Tripathy *et al.*, 2003).

El periodo de incubación varía de 4 a 10 días, y el cuadro clínico puede presentarse como forma cutánea o seca y forma diftérica o húmeda (Tsai *et al.*, 1997).

En la forma cutánea se observan lesiones a nivel de la cabeza, cresta o barbillas, tienen normalmente forma de verruga y son de color amarillento o marrón oscuro. Las aves presentan fiebre, disminución del consumo de pienso o caída de producción y la mortalidad es baja (1-2%). En la forma diftérica las lesiones son amarillo-blancuecinas y de apariencia caseosa y se localizan en la boca, esófago y/o tráquea. Los nódulos pueden aumentar de tamaño dando lugar a disnea o incluso a la muerte del animal por asfixia. La mortalidad puede alcanzar valores del 50% (Tripathy *et al.*, 1997).

El diagnóstico clínico es el más sencillo si la enfermedad se presenta con la forma seca, mientras que en la forma diftérica debería realizarse el diagnóstico diferencial con la LTI. El diagnóstico definitivo debe realizarse en el laboratorio mediante histología (cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos) o por aislamiento e identificación del virus en huevos embrionados de pollo. Se han desarrollado técnicas moleculares (PCR, PCR anidada, análisis de los productos de endonucleasas de restricción, hibridación con sondas genómicas, etc.) para la detección de la viruela aviar (Schnitzlein *et al.*, 1988; Ghildyal *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1997; Fallavena *et al.*, 2002, citados en el Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2004).

El método de control más eficaz es la vacunación mediante una vacuna viva administrada en la membrana del ala, normalmente en combinación con la vacuna de encefalomiелitis, formándose un nódulo en el punto de inoculación a los 7-10 días post-vacunación. De este modo se podría constatar si la aplicación de la vacuna ha sido correcta.

Las vacunas disponibles actualmente en el mercado son las siguientes: AEPOX (viruela + encefalomiелitis), Nobilis Ovodiptherin (Intervet-Shering Plough Animal Health), Hiprapox (Hipra) y BIOPOX (Merial).

1.1.2.1.11. Encefalomiелitis Aviar

Enfermedad vírica causada por un virus del género *Hepatovirus*, familia *Picornaviridae*. Se trata de una infección entérica, por tanto, la principal vía de transmisión es la fecal-oral o por vectores. También se ha demostrado la transmisión vertical causando mortalidad embrionaria, disminución en el número de eclosiones y

nacimiento de pollitos infectados que eliminan virus en la incubadora e infectan a otros pollos susceptibles recién nacidos (Calnek, 2003).

La enfermedad como tal, se produce en animales menores de 3 semanas de vida, manifestando una sintomatología nerviosa (ataxia y parálisis) y queratoconjuntivitis (Buxadé, 2000). La morbilidad oscila entre el 40-60% y la mortalidad entre el 25-50%, aunque estos valores disminuyen si los animales poseen una buena inmunidad. En las aves adultas se observa únicamente una importante caída de la producción mantenida durante 2 ó 3 semanas y una recuperación posterior rápida (Tannock *et al.*, 1994).

Los signos nerviosos junto con la caída de producción e incubabilidad de los huevos fértiles resulta indicativo de la infección. Las aves no muestran lesiones macroscópicas, pero el estudio histológico revela lesiones típicas como meningoencefalitis no purulenta diseminada, manguitos perivasculares, degeneración neuronal en cerebro y médula espinal, gliosis y cromatolisis central de neuronas en cerebro, agregados linfocitarios en proventrículo, molleja, páncreas y otras vísceras) lo cual permite diferenciar la Encefalomielitis de la Encefalomalacia (deficiencia de Vitamina E). Se puede realizar el diagnóstico diferencial con Newcastle, Marek y Bronquitis infecciosa. Para realizar el diagnóstico, también existen técnicas de aislamiento vírico (inoculación en saco vitelino de suspensión de cerebro de pollito infectado) y pruebas serológicas.

Como sucede con las demás enfermedades víricas, no existe tratamiento específico. Puede recurrirse al empleo de antibióticos de amplio espectro autorizados para evitar posibles infecciones secundarias. El plan de control incluye vacunas vivas administradas en la membrana del ala, normalmente junto con la vacuna de viruela aviar. Las vacunas disponibles son las siguientes: AEPOX (viruela + encefalomielitis) y Nobilis AE 1140 (Intervet-Shering Plough Animal Health) y BIO EA (Merial).

1.1.2.1.12. Enfermedad de Gumboro

Enfermedad causada por un virus de la familia *Birnaviridae*, muy resistente en condiciones de falta de limpieza y desinfección (Lukert y Saif, 2003) lo que dificulta su erradicación. Es un virus altamente contagioso y se difunde fácilmente entre los animales a través de los excrementos, pienso, agua, polvo e insectos vectores (Lukert y

Saif, 2003). La ropa y equipos contaminados pueden ser una fuente de infección entre instalaciones o granjas.

Existen dos serotipos del virus, I y II, siendo el I donde se encuentran los responsables de la enfermedad en las aves. La replicación viral provoca en el animal un estado de inmunosupresión que aumenta la susceptibilidad a infecciones secundarias (Lasher y Shane, 1994).

La forma clínica suele presentarse entre las 3 y 6 semanas de edad, observando en los animales: depresión, plumas erizadas, disminución del consumo de pienso, aunque el del agua puede estar aumentado, lo cual produce diuresis y diarrea blanquecina. La mortalidad es variable, aunque en el caso de cepas muy virulentas puede alcanzar hasta el 60% (Van den Berg *et al.*, 1991; Müller *et al.*, 2003).

Las lesiones y los signos clínicos son característicos para realizar el diagnóstico. En los casos agudos, la bolsa de Fabricio está aumentada de tamaño, con aspecto gelatinoso y en algunas ocasiones sanguinolenta. También se pueden ver hemorragias en músculos y los riñones pálidos. En los casos crónicos, la bolsa presenta una marcada atrofia y unas lesiones histológicas muy evidentes, folículos atrofiados y fibróticos. (Cosgrove, 1962; Helmboldt y Garner, 1964; Cheville, 1967, citado por Lukert y Saif, 2003). Existen técnicas serológicas (ELISA, técnicas de precipitación con anticuerpos neutralizantes o por inmunodifusión en ágar) para la determinación de anticuerpos o la búsqueda del virus en la bolsa de Fabricio por las técnicas de RT-PCR (Moody *et al.*, 2000; Majó *et al.*, 2001; Raue y Mazaheri, 2003 citados por Müller *et al.*, 2003) o RFLP “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” (Ture *et al.*, 1998; Jackwood y Sommer, 1999, citados por Müller *et al.*, 2003).

No existe tratamiento, siendo la vacunación la mejor forma de prevenir la enfermedad. Las vacunas inactivadas se administran a las reproductoras para transmitir una inmunidad maternal elevada y uniforme a la descendencia. Las vacunas disponibles son las siguientes: Nobilis 228E, Nobilis D78 (Intervet-Shering Plough Animal Health), Bursine 2 (Fort Dodge), Hipragumboro CH80, Hipragumboro GM97 (Hipra), Gallivac IBD, Vaxxitec (HVT+IBD) (Merial) y Aviproprecise, TAD gumboro VAC (Calier).

1.1.2.1.13. Anemia Infecciosa

El virus de la anemia infecciosa pertenece a la familia *Circoviridae*, género *Gyrovirus* (Hailemariam *et al.*, 2008). La transmisión vertical a partir de las reproductoras infectadas es la principal vía de infección, aunque también se puede dar la transmisión horizontal por ingestión o inhalación (McNulty, 1991; Hoop *et al.*, 1992; Schat, 2003).

La forma clínica o aguda de la enfermedad se presenta en animales jóvenes (10-14 días) que han adquirido la enfermedad vía vertical. Los pollitos están deprimidos y la mortalidad puede superar el 60%. La forma subclínica, en aves mayores, es mucho más común que la clínica y conlleva una disminución de rendimientos productivos, pérdidas económicas y aumento de la susceptibilidad a otras infecciones (Morales y Cardoso, 2005; Hailemariam *et al.*, 2008). Las lesiones macroscópicas descritas son anemia (valores del hematocrito inferiores a 27), médula ósea pálida, atrofia y palidez variable del timo, bursa y bazo, que dependen de la presencia de otros patógenos.

Se pueden observar hemorragias subcutáneas e intramusculares junto con atrofia del sistema linfático y lesiones cutáneas localizadas (también conocida como “Enfermedad del ala azul”). El retraso del crecimiento junto con el aumento de la mortalidad supone importantes pérdidas económicas.

El diagnóstico se basa en los signos clínicos y las lesiones, el valor del hematocrito es altamente indicativo. También se han desarrollado técnicas de PCR para la identificación del virus, inmunofluorescencia y técnicas serológicas ELISA para valorar la seroconversión por el contacto con el virus de campo (Morales y Cardoso, 2005).

No hay tratamiento frente a la anemia infecciosa, el método más eficaz para el control es la vacunación mediante vacunas vivas inactivadas (en la membrana del ala o por inyección subcutánea) de las reproductoras en recría para poder transmitir una inmunidad maternal elevada y uniforme a la descendencia. La única vacuna disponible actualmente en el mercado es la Nobilis CAV P4 (Intervet-Shering-Plough Animal Health).

1.1.2.1.14. Salmonelosis Aviar

El control de la salmonelosis constituye uno de los principales retos para el sector avícola. La importancia radica en las repercusiones en Salud Pública, las restricciones aplicadas a la comercialización de los productos procedentes de granjas infectadas y a las consecuencias sobre los programas sanitarios de las explotaciones (Esteban, 2008).

Se ha sugerido (Rabsch *et al.*, 2000) que la erradicación de los serotipos Pullorum y Gallinarum, gracias a la vacunación, ha permitido la ocupación del nicho ecológico de las aves por salmonelas consideradas de importancia en salud pública como *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis y *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium. Estas presentan una epidemiología muy compleja, asociada a la contaminación ambiental y a la existencia de infinidad de reservorios diferentes de las aves, por lo que es preciso realizar un control exhaustivo mediante medidas de bioseguridad, vacunación e higiene.

La Salmonelosis aviar puede transmitirse verticalmente, propio de ciertos serotipos como Enteritidis (Gantois *et al.*, 2008a, 2008b) y horizontalmente a través de las heces, pienso, agua, insectos (Valiente *et al.*, 2005, 2007a), roedores, aves salvajes, humanos, materiales y equipos, etc., en el caso de todos los serotipos. Las aves salvajes constituyen una importante fuente de infección para el hombre (Hall y Saito, 2008).

La forma subclínica es la más frecuente e importante, ya que se produce un fenómeno de comensalismo entre los diferentes serotipos de salmonela y el ave, sin que se produzca patología. El principal problema es que al localizarse en el tracto digestivo de las aves (Pinheiro *et al.*, 2001) pueden transmitirse a través de las heces a otros animales así como a sus producciones (carne y huevos) y a través de éstas, llegar al ser humano constituyendo una de las principales causas de toxiinfección alimentaria (Berchieri *et al.*, 2001; Gantois *et al.*, 2008a; Dunkley *et al.*, 2008).

La vigilancia y control de *Salmonella* en Europa se ha llevado a cabo desde 1993 de acuerdo con la **Directiva Comunitaria 92/117/CEE**, relativa a medidas de protección contra determinadas zoonosis y determinados agentes productores de zoonosis en animales y productos de origen animal, a fin de evitar brotes de infecciones e intoxicaciones procedentes de los alimentos.

La ambigüedad de esta Directiva, así como la disparidad de criterios y actuaciones asumidas por los distintos países miembros, con la consiguiente distorsión del “Mercado Único”, ha llevado a la Comisión Europea a establecer una legislación más estricta en el ámbito del control de las zoonosis de transmisión alimentaria. Así, en 2003 se publica el **Reglamento (CE) 2160/2003**, sobre el control de *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos.

El objetivo es garantizar que se adopten medidas adecuadas y eficaces para detectar y controlar estos agentes en todas las fases de producción, transformación y distribución, en particular a nivel de producción primaria, con objeto de disminuir su prevalencia y el riesgo que suponen para la salud.

La Legislación Comunitaria también se basa en el **Reglamento (CE) 1168/2006**, por el que se establece el objetivo de reducción de la prevalencia de determinados serotipos de salmonela en gallinas ponedoras, y el **Reglamento (CE) 1177/2006**, respecto a los requisitos de uso de métodos específicos de control en el marco de los programas nacionales de control de salmonela en aves de corral (Alonso, 2007).

La Legislación Nacional contempla la **Orden PRE/1377/2005**, de 16 de mayo, por la que se establecen medidas de vigilancia y control de determinadas salmonelosis en explotaciones de gallinas ponedoras, a efectos del establecimiento de un Programa Nacional. También contempla la **Orden PRE/407/2006**, donde se establece la vacunación preventiva obligatoria de las futuras ponedoras frente a las salmonelas de importancia para la salud pública (Alonso, 2007).

Toda esta Legislación vigente queda recogida en el “Programa Nacional para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella* en gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus*”, en el que se fija el objetivo de reducción de la prevalencia, el área y especies de aplicación y las medidas de actuación para conseguir los objetivos (Alonso, 2007).

Las vacunas disponibles actualmente en el mercado son las siguientes: Intervet-Shering-Plough Animal Health (Nobilis SG9R [vacuna viva serotipo Gallinarum] y Nobilis SALENVAC [vacuna inactivada serotipos Enteritidis + Typhimurium]); Calier (TAD *Salmonella* VAC E [vacuna viva serotipo Enteritidis], TAD *Salmonella* VAC T [vacuna viva serotipo Typhimurium]), FORT DODGE (Poulvac iSE [vacuna inactivada serotipo Enteritidis]); Hipra (Hipratifus [vacuna inactivada serotipo Enteritidis]) y

Merial (Gallivac SE [vacuna viva serotipo Enteritidis], Gallimune SE+ST [vacuna inactivada serotipos Enteritidis + Typhimurium]).

1.1.2.1.15. Cólera Aviar

Enfermedad causada por *Pasteurella multocida*, cuya transmisión fundamental y más importante es por el contacto directo entre las aves infectadas, vía respiratoria (Christensen *et al.*, 2000; Leotta *et al.*, 2006; Mbuthia *et al.*, 2008). Los roedores pueden actuar como vectores de la enfermedad contaminando el agua o el pienso, lo que resulta muy importante el control de los mismos. La gravedad del cuadro clínico depende de factores asociados al hospedador (especie y edad de las aves), de condiciones medioambientales y de las características de la cepa responsable (Christensen *et al.*, 2000; Mbuthia *et al.*, 2008).

En su forma aguda, las aves afectadas presentan una marcada depresión, fiebre, anorexia, diarrea, disnea, plumas erizadas e inflamación y cianosis de cabeza y barbillas. En la crónica, se produce un engrosamiento edematoso de las barbillas, cojeras, caquexia e incluso una disminución del porcentaje de puesta del 5-15% (Christensen *et al.*, 2000; Shivachandra *et al.*, 2005; Woo y Kim, 2006; Mbuthia *et al.*, 2008).

Las pérdidas económicas son cuantiosas ya que las aves que padecen la forma crónica, mantienen su nivel de puesta por debajo de la curva estándar durante todo el ciclo. También hay que destacar las pérdidas originadas por la mortalidad, así como los costes en medicamentos.

Para luchar contra la enfermedad es muy importante extremar las medidas profilácticas y, en los lugares donde aparezca de forma enzoótica se recomienda la vacunación mediante autovacunas.

1.1.3. Colibacilosis: consideraciones generales

1.1.3.1. Importancia de la colibacilosis

Según la segunda edición del manual Bergey (Garrity *et al.*, 2004), el género *Escherichia* está encuadrado dentro del Filum *Proteobacteria*, en la Clase *Gammaproteobacteria*, Orden *Enterobacteriales*, incluido en la Familia *Enterobacteriaceae*.

Escherichia coli (*E. coli*) es la especie tipo del género *Escherichia* (Blanco *et al.*, 2002; Barnes *et al.*, 2003), cuyas características generales son las siguientes:

- Bacilos Gram negativos, catalasa positivos y oxidasa negativos.
- No formadores de esporos.
- Anaerobios facultativos, con un amplio rango de T^a de incubación.
- Inmóviles o móviles mediante flagelos peritricos.
- Necesidades nutricionales sencillas.

E. coli es la especie bacteriana predominante de la microbiota normal aerobia y anaerobia facultativa del aparato digestivo de la mayor parte de los animales y del hombre (Margall *et al.*, 1997; Schroeder *et al.*, 2004; Todar, 2008) y por tanto, se elimina por las heces al exterior.

Se trata, dependiendo de los serotipos, de una de las zoonosis alimentarias más frecuentes e importantes en el hombre debido a la gravedad de los cuadros clínicos y al número de afectados, pudiendo suponer un grave riesgo para la salud pública.

En el hombre, la colibacilosis entérica se produce por la penetración de *E. coli* a través de los alimentos permaneciendo en el epitelio intestinal causando, en general, cuadros de diarrea que en casos más graves pueden evolucionar a disentería, colitis hemorrágica (CH), el síndrome urémico hemolítico (SUH) e incluso a púrpura trombocitopénica (PTT) (Schroeder *et al.*, 2004). Estas cepas, constituyen la principal causa de infecciones urinarias (ITU), meningitis neonatales, septicemias, peritonitis, mastitis, neumonía, etc (Blanco *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 2004; Todar, 2008).

La importancia de la colibacilosis en animales radica en las grandes pérdidas económicas que se generan debido a la disminución de determinados parámetros productivos, pérdida de peso, aumento en los índices de conversión y de la mortalidad y por los elevados costes de los tratamientos (Blanco *et al.*, 1991, 1993, 1996; La Ragione *et al.*, 2002).

En los animales la colibacilosis entérica da lugar a importantes cuadros de diarrea en el ganado bovino, porcino, ovino, perros y conejos. La colibacilosis extraintestinal puede producir ITU y septicemias en perros y gatos, septicemias neonatales en rumiantes y ganado porcino, abortos en el ganado bovino, infecciones respiratorias y septicémicas en aves, y otras como peritonitis, mastitis, infecciones pulmonares y de heridas (Blanco *et al.*, 2002).

El criterio que se ha utilizado durante muchos años para diferenciar los *E. coli* patógenos de los comensales, ha sido la determinación del antígeno somático, pero ha sido necesario conocer la fórmula antigénica completa, así como la determinación de otras características de virulencia, para considerar a una cepa como patógena. (Margall *et al.*, 1997; Delicato *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003; Ewers *et al.*, 2005; OIE, *Terrestrial Manual*, 2008; Todar, 2008).

Las cepas patógenas de *E. coli* se engloban en diferentes grupos o categorías, con unas características y mecanismos de virulencia determinados que actúan conjuntamente para potenciar su patogenicidad, produciendo infecciones y síndromes diferentes (Blanco *et al.*, 2002). Estos grupos son:

1.1.3.1.1. *E. coli* enteropatógeno (ECEP)

La clasificación de las cepas de ECEP comprende aquellas que causan la lesión de adhesión y borrado (*A/E-attaching and effacing*) de las microvellosidades de los enterocitos (Margall *et al.*, 1997) y que no producen VT (Levine *et al.*, 1987) ni poseen capacidad invasiva *in vivo* (Figura 2). La adhesión a células intestinales está relacionada con la expresión de la fimbria BFP (*Bundle Forming Pilus*), necesaria para la producción de diarrea.

En el hombre se produce una diarrea líquida con mucosidad acompañada de vómitos y fiebre. Es frecuente en los países desarrollados y en los países en vía de

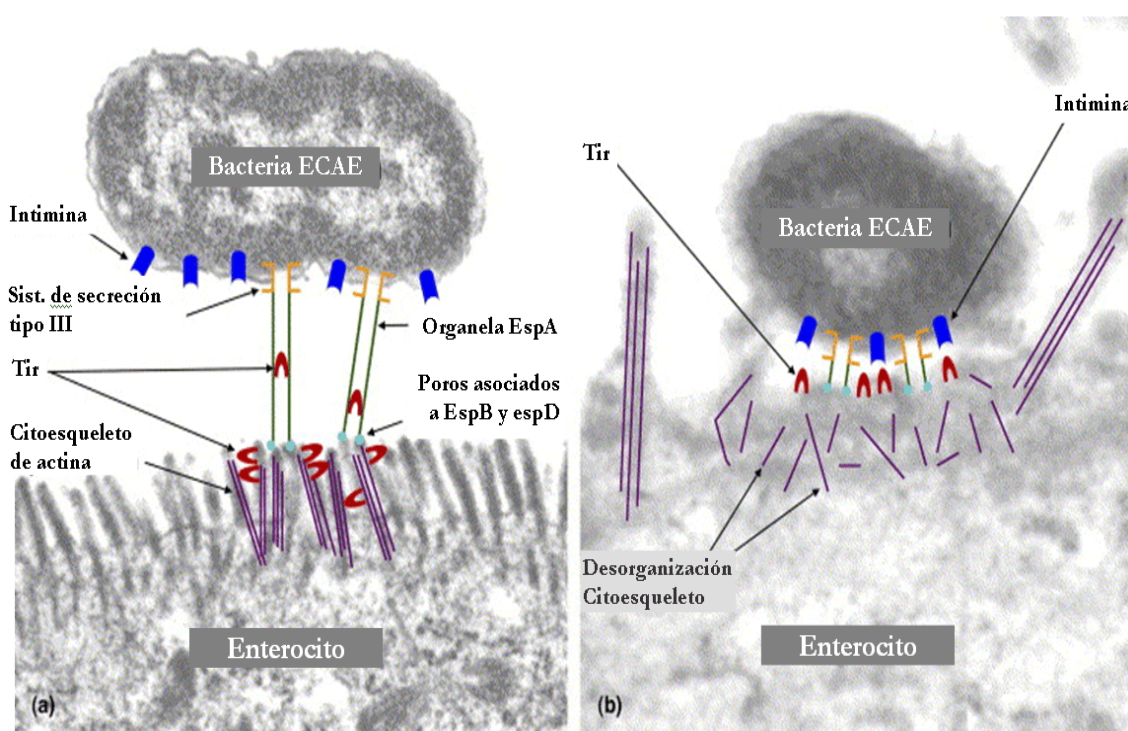
desarrollo. Se considera como una de las principales causas de diarrea infantil, afectando a niños menores de 2 años (Margall *et al.*, 1997; Nataro *et al.*, 1998).

Los rumiantes, especialmente la especie bovina, representan un importante reservorio de cepas de ECEP. En pequeños rumiantes la mayoría de las cepas de ECEP se han aislado de corderos y cabritos y en cerdos afecta tanto a los lechones recién nacidos como a los que están en periodo de destete (Cortés, 2007).

Las cepas que causan diarreas en conejos también provocan lesiones de “adhesión y borrado” y pertenecen a un número reducido de serotipos que son totalmente diferentes a los encontrados en los aislados humanos, así como las adhesinas. Las enteritis causadas por cepas de ECEP constituyen la principal causa de mortalidad y morbilidad en conejos destetados y lactantes en Europa (Cortes, 2007).

También se han descrito cepas de ECEP causantes de diarrea en perros y al igual que en el caso anterior, los serotipos de las cepas de ECEP presentes en perros son distintos a los encontrados en las cepas de ECEP humanas y de conejos (Beutin, 1999; Blanco *et al.*, 2002).

Figura 2. Esquema de los mecanismos que dan lugar a la lesión de adhesión y borrado (Yuste, 2006)



de edad, cursando de modo sobreagudo con diarrea profusa, síndrome febril intenso, elevada mortalidad y sintomatología nerviosa.

En el ganado porcino es responsable de la diarrea neonatal en lechones y enfermedad del edema. Esta última se debe a cepas que además de producir enterotoxinas sintetizan la verotoxina VT2v, responsable de alteraciones neuronales (Blanco *et al.*, 2006). También pueden provocar infecciones urinarias, sistémicas y mastitis.

1.1.3.1.3. *E. coli* enteroinvasivo (ECEI)

El grupo ECEI y *Shigella* spp. se encuentra relacionado genética y bioquímicamente. Se asocia fundamentalmente con brotes de origen alimentario por alimentos importados (Margall *et al.*, 1997), siendo responsables de la “diarrea del viajero”. El mecanismo de patogenicidad de ECEI es la invasión del epitelio del colon, sin producción de toxinas LT y ST, dando lugar a una diarrea disenteriforme acuosa que se manifiesta con sangre y mucosidad en heces acompañado de fiebre y dolor abdominal (Todar, 2008). En algunos casos sólo se produce diarrea, siendo difícil diferenciarla de la producida por ECET (Rodríguez-Angeles, 2002).

1.1.3.1.4. *E. coli* enteroagregativo (ECEA)

La infección por ECEA se ha asociado con la diarrea infantil en países en vías de desarrollo, puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente (Rodríguez-Angeles, 2002). ECEA son *E. coli* que presentan un tipo de fimbrias que les permiten adherirse de un modo agregativo (Todar, 2008) a la mucosa del intestino grueso y delgado, produciendo un aumento de la secreción de mucus que atrapa a las bacterias y que permite su autoaglutinación en una fina película en el epitelio intestinal. Posteriormente estas bacterias liberan la enterotoxina termoestable, ST, responsable del cuadro clínico y de las lesiones histopatológicas a nivel intestinal (Blanco *et al.*, 2002). Se trata de una diarrea persistente acuosa, mucoide e incluso sanguinolenta, de más de 14 días de duración.

1.1.3.1.5. *E. coli* verotoxigénico (ECVT)

El grupo de ECVT son importantes patógenos emergentes, que causan patologías muy severas en los seres humanos, su nombre se debe a la producción de las verotoxinas (Cortés, 2007; Todar, 2008) activas sobre células Vero.

Existen dos tipos de verotoxinas (VT), VT1 y VT2 con diversas variantes entre las que se encuentra VT2e responsable de la enfermedad de los edemas en el ganado porcino (Ramirez *et al.*, 1999). VT1 es casi idéntica a la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1.

Los rumiantes pueden actuar como portadores asintomáticos de cepas de ECVT potencialmente patógenas para el hombre (Blanco *et al.*, 2002; Cortés, 2007). Se han aislado ECVT en otras especies animales como en ganado porcino, gatos y perros (Beutin *et al.*, 1993), sin embargo la frecuencia de aislamiento (7,5%; 13,8% y 4,8% respectivamente) ha sido inferior a la obtenida en rumiantes.

1.1.3.1.5.1. *E. coli* como agente zoonótico: importancia de los animales como reservorio de ECVT

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define como zoonosis a las enfermedades e infecciones que se transmiten de un modo natural entre personas y animales vertebrados. En el caso de la colibacilosis, la verdadera importancia como zoonosis reside en determinados serotipos de ECVT responsables de toxiinfecciones alimentarias en el ser humano (Barnes *et al.*, 2003).

Dentro de los serotipos de ECVT, sólo los denominados colectivamente *E. coli* enterohemorrágicos (ECEH), como el O157:H7 ó H-, O26:H11, O111:H-, O145:H-, O45:H2, O128:H-, O4:H-, O103:H2 son los responsables de los cuadros clínicos más graves (Beutin *et al.*, 1993; Margall *et al.*, 1997).

El serotipo O157:H7 es el más importante dentro de este grupo, vinculándose frecuentemente con infecciones humanas en todo el mundo, provocando numerosos brotes de colitis hemorrágica especialmente en Canadá, EE.UU., Japón y el Reino Unido (Blanco *et al.*, 1997; Karmali, 1989; Blanco *et al.*, 2003). En España, los casos esporádicos de infecciones intestinales por ECVT O157 son relativamente frecuentes y se han

producido algunos brotes causados principalmente por el serotipo O157:H7 (Blanco *et al.*, 2003).

En los rumiantes, la población de ECVT forma parte de la microbiota saprofita del intestino (Rashid *et al.*, 2007) actuando como principal reservorio de ECEH O157:H7 para el hombre (Beutin *et al.*, 1993, Blanco *et al.*, 1996b; Radu *et al.*, 2001; Feder *et al.*, 2003; Cortés, 2007). También se han aislados *E. coli* O157:H7 en heces procedentes de ganado porcino (Feder *et al.*, 2003).

Los programas nacionales de vigilancia tienden a concentrarse en el serotipo O157:H7, las infecciones en el hombre se presentan con mayor frecuencia como brotes de transmisión alimentaria en comunidades tales como familias, colegios, guarderías y residencias de ancianos (Cortés, 2007).

El nivel de contaminación es directamente proporcional con el nivel de infección intestinal, excreción fecal y la higiene. La contaminación puede ocurrir durante las fases de ordeño o el sacrificio y procesado de las canales (Cortés, 2007). Suele derivar del consumo de hamburguesas y derivados cárnicos poco cocinados (Beutin *et al.*, 1993; Margall *et al.*, 1997; Radu *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2003; OMS 2007) También se han descrito brotes por el consumo de leche no pasteurizada, queso elaborado con leche cruda (Espie *et al.*, 2006), frutas, espinacas y lechugas, yogur, bebidas (sidra y zumos de manzana), agua contaminada (OMS, 2007; Söderström *et al.*, 2008) y transmisión entre personas (Margall *et al.*, 1997).

En el hombre, la CH se caracteriza por un cuadro severo de dolor abdominal y diarrea sanguinolenta. Aproximadamente el 10% de los pacientes pueden sufrir complicaciones y desarrollar el SUH donde se produce el cuadro anterior junto con una infección renal, incluso coma y muerte. La progresión de este síndrome es la PTT en la que se produce además una infección del sistema nervioso central (Margall *et al.*, 1997).

Se han realizado diversos estudios sobre la prevalencia de ECVT en ganado bovino y ovino, la mayoría de ellos centrados en el serotipo O157:H7 demostrando que la excreción de ECVT puede estar influenciada por factores como la edad, dieta, estrés, alojamiento y efectos estacionales (Cortés, 2007). La prevalencia descrita en vacuno en cuanto a la detección de ECVT varía enormemente de acuerdo con el país y el método de detección (los basados en PCR dan valores superiores) siendo del 0,1-63% en los

animales y en los rebaños oscila entre el 0,3-87% (Blanco *et al.*, 1993; Beutin *et al.*, 1993; Margall *et al.*, 1997; Cortés, 2007).

Una de las causas por las que el ganado bovino es portador asintomático de ECVT, es que carece de receptores para las VT en las células endoteliales de los vasos de la mucosa intestinal, a diferencia de la especie humana (Pruimboom-Brees *et al.*, 2000). Los terneros pueden adquirir ECVT de sus madres en el nacimiento, a partir de otros animales y del ambiente.

A pesar de que las cepas aviarias patógenas representen un bajo riesgo de enfermedad para el hombre (1-50% de los aislados son ECEH no O157), se ha podido demostrar que los pollos son susceptibles de ser colonizados por el serotipo O157:H7. Por tanto, podrían actuar como hospedadores y posible reservorio para el hombre (Beery *et al.*, 1985; Barnes *et al.*, 2003).

Se han estudiado similitudes entre cepas patógenas de *E. coli* aviarias (APEC) y de origen humano, responsables de infecciones extraintestinales, sugiriendo que las cepas aviarias podrían actuar como agentes potencialmente zoonóticos (Dho-Moulin *et al.*, 2007).

Existen referencias en cuanto a la presencia de cepas de ECVT en palomas, lo que las convierte en un reservorio natural y un riesgo sanitario para el hombre (Barnes *et al.*, 2003). En Escocia, ha sido posible vincular epidemiológicamente cepas de *E. coli* O157:H7 de terneros y gansos salvajes que vivían en contacto (Synge, 2000).

Hay estudios que indican que los aislados APEC podrían resultar patógenos para los mamíferos (Jonson *et al.*, 2006; Skyberg *et al.*, 2006) y referencias en las que cepas humanas y aviarias presentan similitudes o comparten serotipos y factores de virulencia (Siek *et al.*, 2005b; Dho-Moulin *et al.*, 2006), sugiriendo que los APEC podrían actuar reservorio de factores de virulencia para los seres humanos.

1.1.3.2. Colibacilosis aviar

Es una enfermedad muy importante en la avicultura de puesta ya que supone un serio problema en relación con la salud animal, por ser una de las principales causas de enfermedad, mortalidad y pérdidas económicas en las granjas avícolas de puesta (Ewers *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2004; Vandekerchove *et al.*, 2004a). Este hecho se debe a la frecuencia con la que se presenta y a la disminución de índices productivos y de bienestar animal. (Dho-Moulin *et al.*, 1993; Gyles *et al.*, 1993; Gross *et al.*, 1994; Barnes *et al.*, 2003; Vandekerchove *et al.*, 2004c; Monroy *et al.*, 2005; Ask *et al.*, 2006).

1.1.3.2.1. Antecedentes y estado actual

Desde finales del siglo pasado se conoce la capacidad de *E. coli* de producir enfermedades en las aves domésticas. En 1885, Theodor Escherich consiguió aislar *E. coli* en muestras clínicas humanas, denominándolo inicialmente como *Bacterium coli commune* (Blanco *et al.*, 1996; Todar, 2008).

En 1894, Lignieres describió una enfermedad en gallinas causada por *E. coli* y se confirmó, mediante estudios *in vivo*, su patogenicidad en las aves. En 1897 se detectan casos de pericarditis en pollos y pavos, con aislamientos de *E. coli* en algunos casos.

Claussen, en 1907, concluyó que en determinadas condiciones *E. coli* podría atravesar la pared intestinal, adquiriendo factores que le confirieran virulencia y causar septicemias en gallinas (Sojka *et al.*, 1961). Esto ocurría especialmente cuando las defensas del animal disminuían como consecuencia de enfermedades, situaciones de hambre, sed, frío, malas condiciones de ventilación, etc. Es decir, ya se puntualizaba sobre la importancia de las medidas de bioseguridad deficientes y los factores predisponentes en el desarrollo de la colibacilosis.

En 1947, Kauffmann propone una forma de diferenciar las cepas de *E. coli* en base a la determinación de los antígenos de superficie. Esta forma de clasificación resultó muy útil en los estudios epidemiológicos y de patogénesis de *E. coli*, facilitando la diferenciación entre cepas virulentas e inoñas. Estudios realizados por Gross (1958) y

Sojka (1961) pusieron de manifiesto la importancia de determinados serotipos (O1, O2 y O78) en la virulencia de las cepas aviares.

Sin embargo, la elevada diversidad de serotipos implicados en los cuadros clínicos de colibacilosis ha hecho necesario el desarrollo de nuevas técnicas que indiquen el grado de virulencia de las cepas, mediante la determinación de genes de virulencia (Ewers *et al.*, 2004, 2005). La virulencia designa el carácter patogénico de un microorganismo, es decir, su capacidad de causar enfermedad.

Estudios realizados en la década de 1980 sobre los mecanismos de patogenicidad de *E. coli* confirman la teoría en la se defiende que aquellas cepas de la microbiota normal intestinal que presenten determinados factores de virulencia serían las responsables de provocar enfermedad (Morris *et al.*, 1985; Blanco *et al.*, 1991).

Hasta mediados de la década de 1990, la gran mayoría de los estudios sobre colibacilosis se centraban en la producción de *broilers* (producción avícola de carne). Es a partir de entonces cuando se decide ampliar el estudio de esta enfermedad por las grandes pérdidas ocasionadas en el sector avícola de puesta (Vandekerchove *et al.*, 2004c).

A pesar de la importancia de la enfermedad, se desconocen muchos de los mecanismos de virulencia de las cepas aviares de *E. coli* (Johnson *et al.*, 2004). En años recientes se han descubierto varios genes implicados en mecanismos de virulencia de la bacteria, adquiriendo los *E. coli* patógenos aviares la denominación específica de APEC, *Avian Pathogenic Escherichia coli* (da Silveira *et al.*, 2002).

1.1.3.2.2. Epidemiología de la colibacilosis

La mayor parte de los cuadros clínicos de colibacilosis son de origen respiratorio (Dho-Moulin *et al.*, 2007), aunque no se descarta que algunos sucedan al atravesar las bacterias la pared intestinal (Blanco *et al.*, 1996a, 2002; Ewers *et al.*, 2004). La mayor parte de los brotes de colibacilosis suelen ocurrir en el periodo de pico de puesta donde la mortalidad acumulada puede llegar a superar valores al 10% (Vandekerchove *et al.*, 2004a, 2004b).

La colibacilosis suele ser considerada como una enfermedad secundaria, originada por un estado de inmunodepresión debida a enfermedades, como la Bronquitis Infecciosa, Newcastle, Micoplasmosis (Brée *et al.*, 1989; Nakamura *et al.*, 1992; Kariyawasam *et al.*, 2002; La Ragione *et al.*, 2002; Barnes *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003) o la Enfermedad de Gumboro (Nakamura *et al.*, 1990). La presencia de lesiones primarias, como daños en los cilios traqueales y alteraciones en el sistema respiratorio, facilitaría la entrada, colonización y diseminación secundaria de *E. coli*.

Además de un origen infeccioso, pueden existir otros factores (Tabla 1) que incrementan la susceptibilidad de las aves para padecer una infección por *E. coli* (Barnes *et al.*, 2003). También puede haber factores capaces de disminuir dicha susceptibilidad como factores inmunológicos (inmunidad activa y pasiva, adición de inmunoestimulantes), fisiológicos (genética, aves adultas, hembras, estrés moderado, etc) y nutricionales (aporte de proteínas, vitamina A, D, C y E, β -carotenos, selenio, etc).

Tabla 1. Factores predisponentes para el desarrollo de una infección por *E. coli* (Barnes *et al.*, 2003)

FACTORES PREDISPONENTES	
VIRUS	Adenovirus Aviar, Pneumovirus Aviar, Anemia Infecciosa, Enteritis Hemorrágica, Bronquitis Infecciosa, Enfermedad de Gumboro, Laringotraqueitis Infecciosa, Influenza Aviar, Enfermedad de Marek, Enfermedad de Newcastle
BACTERIAS	<i>Bordetella avium</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Mycoplasma gallisepticum</i> , <i>Mycoplasma meleagridis</i> , <i>Mycoplasma synoviae</i> .
PARASITOS	<i>Ascaridia dissimilis</i> , <i>Ascaridia galli</i> , <i>Eimeria brunetti</i> , <i>Eimeria tenella</i> , <i>Cryptosporidium baileyi</i> , <i>Histomonas meleagridis</i> , <i>D. gallinae</i> .
AMBIENTALES	Agua contaminada, exceso de partículas de polvo, restricciones de agua y/o comida, ventilación inadecuada, acúmulo de gases, temperaturas extremas, exceso de ruido, superpoblación, etc.
FISIOLOGICOS	Edad, periodo de pico de puesta, estrés, picaaje, nerviosismo.

Todos estos factores conllevan a una situación óptima para el desarrollo y transmisión de la colibacilosis (Sojka *et al.*, 1961; Dho-Moulin y Lafont, 1982; Rosenberg *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1985; Brée *et al.*, 1989; González *et al.*, 1990; Leitner *et al.*, 1992;

Nakamura *et al.*, 1992; Dho-Moulin 1993; Gross 1994; Buxadé *et al.*, 2000; La Ragione *et al.*, 2002).

Además de ser considerada una enfermedad secundaria, autores como Nakamura *et al.*, (1992), Gross, (1995), Barnes *et al.*, 2003; Vandekerchove *et al.*, (2004a, 2004c) y Ask *et al.*, (2006), describen la colibacilosis aviar como una entidad propia, defendiendo a *E. coli* como un agente patógeno primario. Se trataría de una enfermedad septicémica caracterizada por una mortalidad aguda y presencia de poliserositis, sin afectación en la producción y calidad de los huevos. Vandekerchove *et al.*, (2004a), lograron reproducir experimentalmente la enfermedad en aves libres de microorganismos patógenos específicos (SPF) mediante inoculación por aerosol de *E. coli* en sacos aéreos y también oralmente, determinando que los brotes de elevada mortalidad no se encuentran relacionados necesariamente con otras enfermedades predisponentes.

Numerosos autores hacen referencia al origen cloacal de las cepas patógenas causantes de septicemias en aves (Sojka *et al.*, 1961, 1965; Morris *et al.*, 1985; Whittam *et al.*, 1988; Frommer *et al.*, 1990; Dozois *et al.*, 1992, Leitner y Seller, 1992; Nakamura *et al.*, 1992; Dozois *et al.*, 1994; Blanco *et al.*, 1996c, 1997; Vidotto *et al.*, 1997; Wooley *et al.*, 1998; Dho Moulin *et al.*, 1999). Las cepas patógenas presentan unas características diferenciales que no siempre poseen los aislados comensales ni aquellas cepas con baja o escasa patogenicidad. Hay estudios en los que se indica que el 10-15% de la población de bacterias coliformes intestinales pertenece a serotipos patógenos (Barnes *et al.*, 2003).

Las cepas patógenas pueden diseminarse ampliamente por la formación de aerosoles a partir de las heces contaminadas y adherirse a las células del epitelio del tracto respiratorio superior mediante fimbrias F1, iniciándose la colonización bacteriana (Dozois *et al.*, 1994; McPeake *et al.*, 2005).

En las aves, las zonas de intercambio de oxígeno de los sacos aéreos y de los pulmones son dos puntos altamente susceptibles a la colonización e invasión bacteriana debido a la inexistencia de macrófagos alveolares que puedan contener la infección a este nivel y a que la barrera existente entre la región capilar aérea y la sangre es extremadamente fina (Blanco *et al.*, 1996c; Mellata *et al.*, 2003). Posteriormente se produce la diseminación de *E. coli* por el torrente circulatorio y la colonización de órganos internos, gracias a la capacidad de adhesión mediada por fimbrias P (que se expresan en el tracto respiratorio inferior y en los órganos internos), es decir, en fases más avanzadas de la infección (Barnes *et al.*, 2003; McPeake *et al.*, 2005; Monroy *et al.*, 2005).

1.1.3.2.3. Sintomatología y lesiones

La característica clínica más importante de la colibacilosis aviar es la colisepticemia y se produce por la afectación de numerosos órganos internos como el corazón, hígado, bazo, ovario, etc. (Gross y Siegel, 1959; Sojka y Carnaghan, 1961; Nagi y Mathey, 1972; Piercy y West, 1976; Gross y Domermuth, 1980; Shane, 1981; Morley y Thomson, 1984; Randall *et al.*, 1984; Filali *et al.*, 1988; Gross, 1991; Gross *et al.*, 1994; Barnes *et al.*, 1997; Dho-Moulin *et al.*, 1999; Buxadé *et al.*, 2000; Chansiripornchai *et al.*, 2001; Ewers *et al.*, 2003; Jordan *et al.*, 2005; Landman *et al.*, 2006; Dho-Moulin *et al.*, 2007).

Existe una gran diferencia entre las variedades de *E. coli* y su habilidad para causar enfermedad, entre los dos extremos se encuentran todos los rangos de patogenicidad.

Los síntomas varían con el lugar preferente de localización de la infección, reconociéndose las siguientes formas:

- **Forma respiratoria**

La colibacilosis aviar, suele iniciarse a nivel del tracto respiratorio. La alteración de la mucosa del aparato respiratorio, debida a la acción de determinados agentes, supone una importante vía de entrada para *E. coli* (Barnes *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003). Cuando *E. coli* atraviesa la mucosa del tracto respiratorio y alcanza el torrente circulatorio, se origina una infección sistémica generalizada o colisepticemia, donde se observan (Figuras 3 y 4) lesiones como perihepatitis, peritonitis y pericarditis fibrinosa (Blanco *et al.*, 1996a; Kariyawasam *et al.*, 2002; Barnes *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003; Vandekerchove *et al.*, 2004c; McPeake *et al.*, 2005; Dho-Moulin *et al.*, 2007).

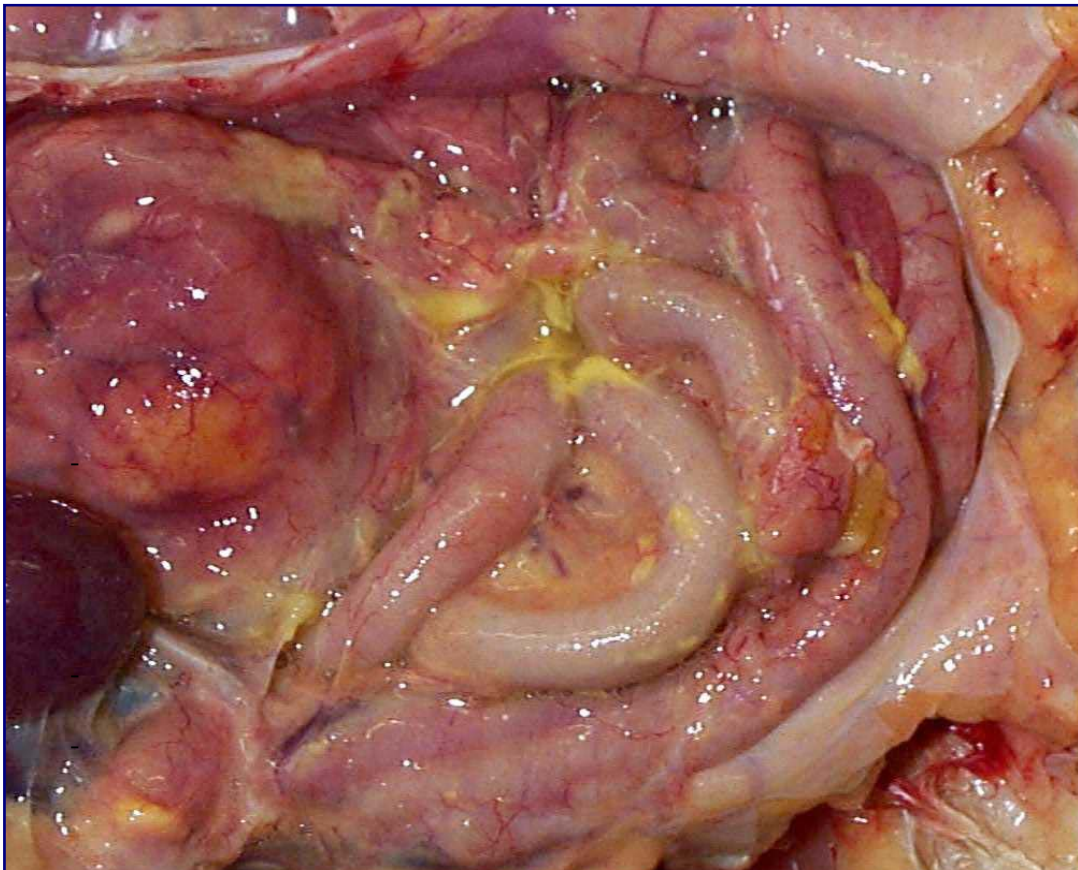
A nivel respiratorio las lesiones se localizan en la tráquea, pulmones y sacos aéreos, pudiendo presentar estos últimos un aspecto opaco y con exudado caseoso de intensidad variable (Barnes *et al.*, 2003).

Suele afectar a animales jóvenes, de forma aguda, alcanzándose valores aproximados del 50% de morbilidad y del 5-10% de mortalidad. Entre los síntomas clínicos que se manifiestan, se puede observar dificultad respiratoria o disnea acompañada de estertores.

Figura 3. Perihepatitis y pericarditis fibrinosa por *E. coli* (cortesía Dr. M. Pizarro)



Figura 4. Peritonitis fibrinosa debida a una infección por *E. coli* (cortesía A. Payés, Hipra)



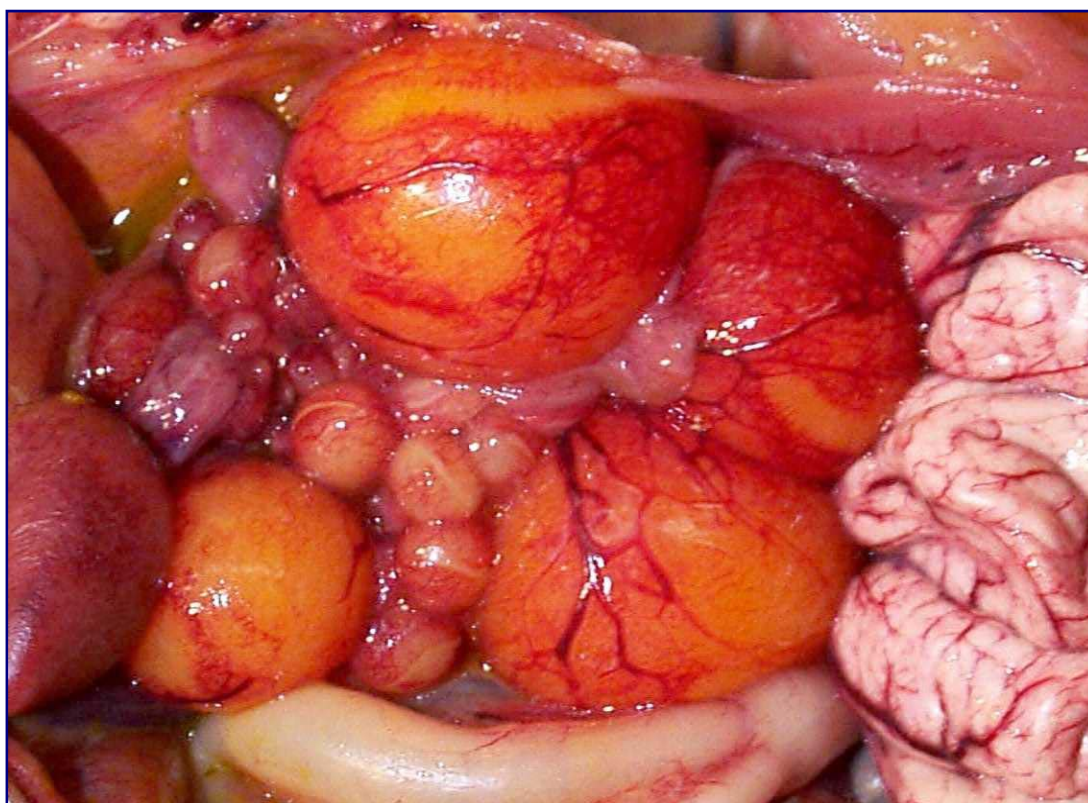
- **Forma genital o reproductora**

La principal vía de infección del oviducto suele producirse por contaminación fecal a partir de la cloaca. También están descritas otras vías de infección como la producida a partir del tracto respiratorio por invasión, diseminación y colonización de órganos internos e incluso por el paso de las bacterias a través del lumen intestinal (Landman *et al.*, 2006). Se han descrito casos de infecciones ascendentes desde el oviducto a la cavidad peritoneal, cursando con peritonitis (Trampel *et al.*, 2007).

Es una enfermedad crónica y de curso lento, con una mortalidad en torno al 2-3%. Los rendimientos productivos de las gallinas ponedoras disminuyen ya que se produce una leve caída de la puesta (Vandekerchove *et al.*, 2004c).

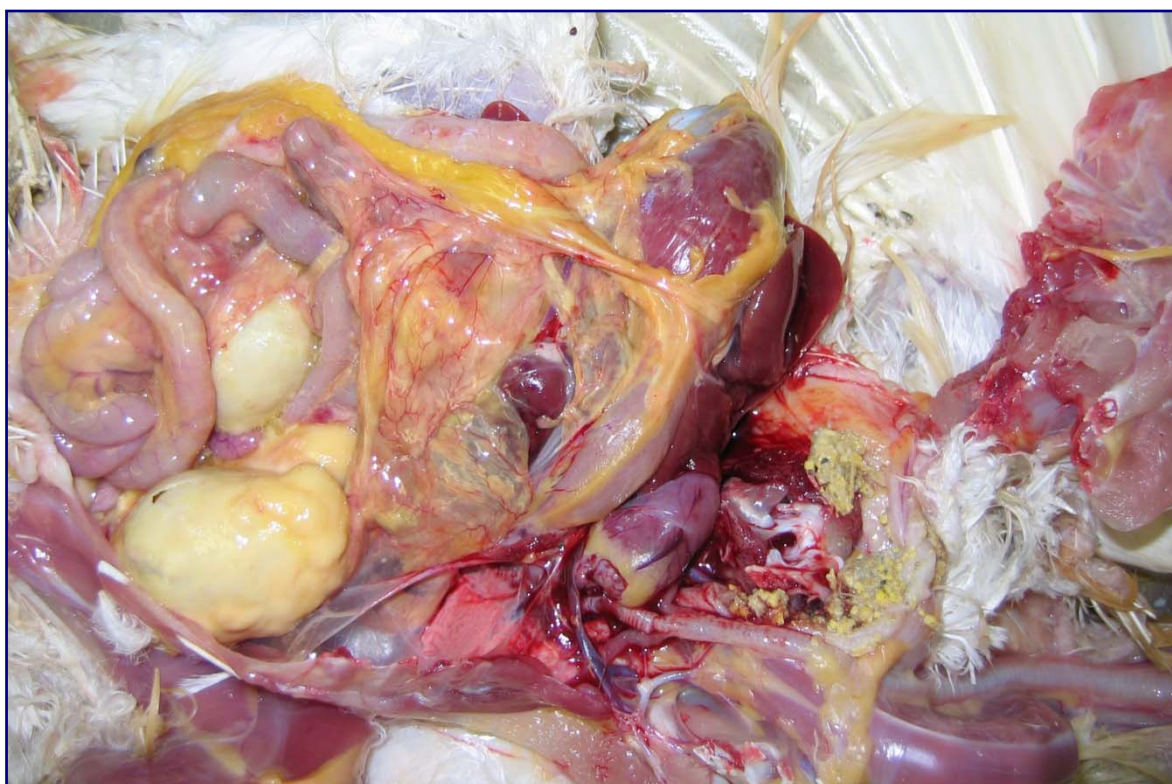
El oviducto presenta una notable congestión y dilatación (Figura 5) de la mucosa pudiendo encontrar un contenido purulento en el interior (Blanco *et al.*, 1996a), incluso masas caseosas, en animales mayores.

Figura 5. Inflamación y congestión hemorrágica del ovario y oviducto por *E. coli* (cortesía A. Payés, Hipra)



Aunque pueden presentarse de modo independiente (Jordan *et al.*, 2005), la forma clínica más frecuente es la combinación de salpingitis con peritonitis (Figura 6). La peritonitis suele observarse más en cuadros agudos que en formas crónicas, mientras que la salpingitis puede presentarse en ambos casos.

Figura 6. Salpingitis y peritonitis fibrinosa en gallina ponedora producido por *E. coli*
(Cortesía Dr. M.Pizarro)



Otras presentaciones menos frecuentes de la colibacilosis son:

- **Enteritis:** habitualmente suele existir una lesión primaria a nivel intestinal debido a la acción de virus entéricos (Barnes *et al.*, 2003), lo que se convierte en un excelente factor predisponente para *E. coli*. Se produce una fuerte inflamación del intestino, enteritis catarral, acompañada de un engrosamiento de la pared (Vandekerchove *et*

al., 2004c). El principal síntoma es una diarrea severa acompañada de mucosidad excesiva.

- **Sinovitis y artritis:** se produce una inflamación a nivel de los tendones y articulaciones de las aves (Blanco *et al.*, 1996a; Vandekerchove *et al.*, 2004c). Puede afectar a los espacios vertebrales causando espondilitis e incluso cursar con parálisis (Barnes *et al.*, 2003). Suele producirse tras una colisepticemia y en combinación con otros microorganismos, como los pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* (*S. aureus*) y *Mycoplasma* (*M. synoviae*).
- **Coligranulomatosis:** se presenta ocasionalmente y se caracteriza por la aparición de nódulos de tamaño considerable en el hígado, ciego, duodeno y mesenterio (Blanco *et al.*, 1996a). Aunque los síntomas y lesiones dependen de la extensión del tejido afectado, suele diagnosticarse sólo a través de la necropsia.
- **Onfalitis** (infección del ombligo): la infección del huevo en formación se produce gracias a la transmisión transovárica (Barnes *et al.*, 2003) generándose una infección del saco vitelino y una onfalitis (Blanco *et al.*, 1996a), produciendo un incremento de la mortalidad embrionaria.

1.1.3.2.4. Diagnóstico: sistemas de identificación y caracterización de aislados de *E. coli*

El diagnóstico presuntivo de la colibacilosis puede realizarse en función de la sintomatología y, aunque las lesiones clínicas son bastante significativas, siempre es conveniente realizar la confirmación mediante el análisis microbiológico de las muestras tomadas (Landman *et al.*, 2006).

El diagnóstico diferencial es de vital importancia ya que muchos agentes infecciosos como *Aerobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Bacillus* spp., han sido aislados a partir de lesiones compatibles con colibacilosis. Así, la pericarditis puede producirse en infecciones por *Chlamydophila* spp., y en determinadas condiciones, por *Pasteurella* spp. y *Streptococcus* spp. *M. gallisepticum* y *Chlamydophila* spp. han sido aislados a partir de lesiones de aerosaculitis y *Pasteurella* spp., *Salmonella*, spp. y *Streptococcus* spp. podrían producir cuadros agudos de septicemia (Barnes *et al.*, 2003).

Los sistemas de identificación y tipificación de las cepas de *E. coli* aviaries son muy variados y tienen como objetivo fundamental distinguir entre cepas patógenas y no patógenas, gracias a la determinación de características de virulencia, así como el establecimiento de las relaciones epidemiológicas entre las cepas (Blanco *et al.*, 2002).

❖ Aislamiento e identificación

Tras la toma de muestras, se procede al aislamiento en medios de cultivo, los más utilizados son:

- Ágar Columbia con 5% de sangre de cordero, excelente medio de cultivo general (no selectivo) altamente enriquecido en el que se puede valorar la capacidad hemolítica de los microorganismos patógenos, propiedad muy importante desde el punto de vista taxonómico (Vandekerchove *et al.*, 2004c; McPeake *et al.*, 2005)
- Ágar BHI “Brain heart infusión agar”, medio muy nutritivo excelente para el crecimiento y aislamiento de microorganismos exigentes y Ágar Luria-Bertani (LB), de gran valor nutritivo y óptimo para el crecimiento y mantenimiento de *E. coli* sobre todo en protocolos moleculares (Ngeleka *et al.*, 1996; Delicato *et al.*, 2003; Ewers *et al.*, 2005; Mokady *et al.*, 2005; Dho-Moulin *et al.*, 2006).
- También existen medios de cultivo selectivos diferenciales como el Ágar McConkey (Gomis *et al.*, 2001; Radu *et al.*, 2001; Da Silveira *et al.*, 2002; Jeffrey *et al.*, 2002; Rodríguez-Angeles, 2002; Barnes *et al.*, 2003; Skyberg *et al.*, 2003; Siek *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). Se utiliza fundamentalmente para el aislamiento de miembros de la Familia *Enterobacteriaceae* y diferenciación de *E. coli* de otros patógenos intestinales de la misma familia. Los componentes selectivos lo constituye el Cristal Violeta (inhibidor de los microorganismos Gram positivos) y las Sales Biliares.
- Las cepas de *E. coli* del serotipo O157:H7 presentan unas características diferenciales respecto al resto de *E. coli*: son sorbitol negativas, en medio sólido Ágar McConkey sorbitol (Blanco *et al.*, 1996c, 2002; Radu *et al.*, 2001; Rodríguez-Angeles, 2002; Barnes *et al.*, 2003) y β -glucuronidasa negativas (Margall *et al.*, 1997; Crespo *et al.*, 1998). Además, crecen en presencia de telurito y cefixima,

para ello existe un medio de cultivo denominado Ágar McConkey sorbitol + telurito + cefixima (Blanco *et al.*, 2002).

La identificación a nivel de género y especie suele realizarse con pruebas bioquímicas, tras un examen de la morfología y el crecimiento bacteriano (Barnes *et al.*, 2003). Algunas de las pruebas que se utilizan con mayor frecuencia son las que determinan la producción de Indol a partir del triptófano, la fermentación del ácido fórmico (rojo de metilo y Voges-Proskauer) y la utilización del citrato como única fuente de carbono (Citrato de Simmons). Estas pruebas constituyen colectivamente el método IMVIC “Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer y Citrato” (Blanco *et al.*, 2002; Vandekerckhove *et al.*, 2004c). También son importantes para la identificación bioquímica de *E. coli*, pruebas bioquímicas como la hidrólisis de la urea, producción de sulfuro de hidrógeno y las pruebas de la lisina y ornitina descarboxilasa.

Una alternativa a los métodos tradicionales, son los sistemas comerciales automatizados, que permiten una identificación rápida y fiable de todas las especies de enterobacterias con significación clínica, por ejemplo, los sistemas multisustratos de identificación bioquímica (Kariuki *et al.*, 1999; Skyberg *et al.*, 2003) como las Galerías API®, API20E, bioMérieux (Figura 7).

Figura 7. Galería multisustrato para la identificación bioquímica de *E. coli*



❖ Tipificación de las cepas

○ Tipificación molecular

Son técnicas moleculares destinadas a la identificación de pequeñas zonas de heterogeneidad dentro del cromosoma bacteriano (Old y Threlfall, 1998).

Con el fin de complementar a los métodos tradicionales de tipificación (serotipado, biotipado y fagotipado) se han desarrollado, en los últimos años, una serie de técnicas moleculares basadas en la caracterización del genotipo de los microorganismos mediante el análisis del ADN cromosómico y plasmídico (Old y Threlfall 1998; Kariuki *et al.*, 1999b; Garaizar *et al.*, 2000; Liébana *et al.*, 2001).

Entre los métodos de tipificación basados en la caracterización del ADN plasmídico podríamos citar la identificación de plásmidos que contienen genes de virulencia (Old y Threlfall 1998; Kariuki *et al.*, 1999b). Más recientemente, se han desarrollado técnicas moleculares destinadas a la identificación de pequeñas zonas de heterogeneidad dentro del cromosoma bacteriano (Old y Threlfall 1998). Los métodos basados en el estudio del ADN cromosómico utilizados en el presente estudio son:

1. Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se fundamentan en la amplificación de secuencias específicas de ADN, con el fin de producir grupos de fragmentos característicos dependiendo del origen del molde de ADN. Existe un elevado número de técnicas de PCR descritas. Se puede determinar por ejemplo, el grado de virulencia de los aislados de *E. coli* gracias a la detección de genes de virulencia (Jeffrey *et al.*, 2002; Delicato *et al.*, 2003; Ewers *et al.*, 2003; Skyberg *et al.*, 2003; McPeake *et al.*, 2005; Siek *et al.*, 2005), también se pueden determinar serotipos como *E. coli* O157:H7 (Radu *et al.*, 2001), plásmidos de virulencia (Jonson *et al.*, 2006) y genes que codifican toxinas (Rodríguez-Angeles, 2002).

2. Electroforesis de campo pulsado (PFGE) “Pulsed Field Gel Electrophoresis”

Se trata de un método de tipificación genética altamente efectiva para un amplio número de especies bacterianas (Tenover *et al.*, 1995). Se ha utilizado como herramienta

con la que analizar tanto brotes clínicos como casos aislados para conocer o descartar su posible relación filogenética (Davis *et al.*, 2003). También se utiliza para realizar estudios de vigilancia epidemiológica (Swaminathan *et al.*, 2001).

Consiste en una modificación de la electroforesis convencional en gel de agarosa que permite el análisis del genoma completo de la bacteria en un único gel. Esta técnica se describió por primera vez en 1984 como una herramienta para el estudio del ADN cromosómico de los organismos eucariotas (Schwartz y Cantor, 1984).

En esta técnica se analiza el patrón de restricción de todo el ADN cromosómico bacteriano, utilizando endonucleasas de baja frecuencia de corte, que generan un número limitado e interpretable de fragmentos (entre 10 y 30) cuyo tamaño oscila entre 10 y 800 Kb (Maslow *et al.*, 1993).

En general, el PFGE es una de las técnicas moleculares de tipificación disponible con una mayor reproducibilidad y poder de discriminación, lo que hace que sea el método de elección en muchas especies bacterianas como *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., etc. (Tenover *et al.*, 1995; Rodríguez-Angeles, 2002; Téllez, 2003).

La interpretación de los geles de PFGE es relativamente complicada y subjetiva, de modo que se han publicado unas normas consensuadas (Tenover *et al.*, 1995) para la determinación de las variaciones en los perfiles de restricción y su posible relación epidemiológica.

○ **Tificación mediante determinación antigénica**

Como el resto de enterobacterias, el género *Escherichia* posee varios tipos de antígenos principales (Figura 8), que tienen una clara aplicación diagnóstica, de identificación y taxonómica: antígenos somáticos, capsulares, flagelares y fimbriales (Le Minor, 1992; D'Aoust, 1997; Old y Threlfall, 1998).

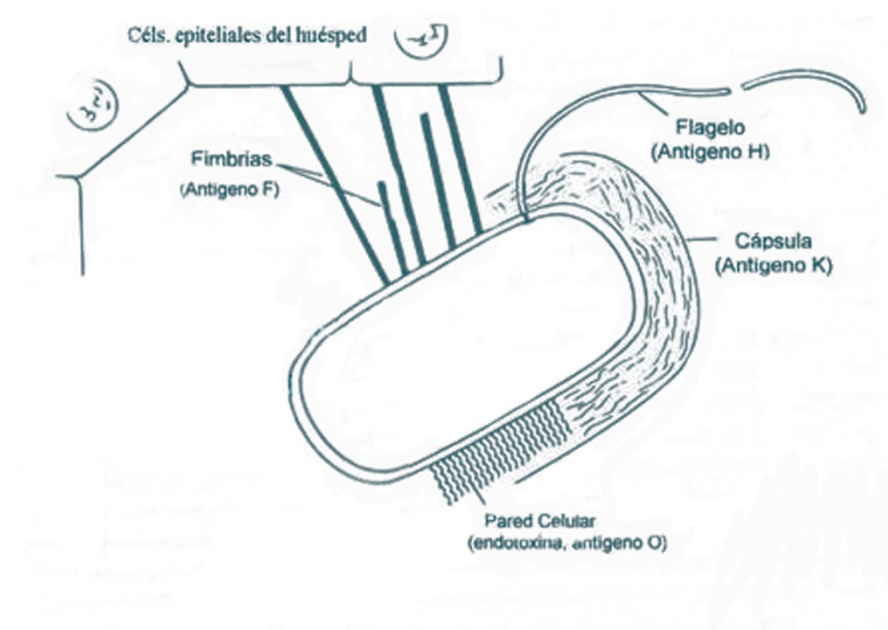
- ◆ El antígeno somático (O) o de pared celular es un polisacárido termoestable (estable tras calentamiento a 121°C durante 2 horas) que forma parte del

lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de la pared celular (Blanco *et al.*, 2002).

- ◆ Los antígenos capsulares (K) o de superficie se corresponden con el polisacárido capsular que envuelve la pared celular y enmascara el antígeno O inhibiendo su aglutinación. Hay 2 variedades, K (L) que se inactiva tras el calentamiento a 100°C durante 1 hora y K (A) para los que son necesarias exposiciones a 121°C durante 2 horas (Blanco *et al.*, 2002).
- ◆ Los antígenos flagelares (H) son proteínas termolábiles, se inactivan por calor a 100°C durante 30 minutos (Blanco *et al.*, 2002).
- ◆ También existen los antígenos fimbriales (F), implicados en la adhesión a las células hospedadoras (Barnes *et al.*, 2003).

Figura 8. Principales antígenos de superficie (O, K, H y F) en *E. coli*

(Modificada de Blanco *et al.*, 2002)



Al igual que en otras enterobacterias, se ha desarrollado un esquema de serotipificación llamado de “Kauffman-White” (Kauffmann, 1966). Aunque existen numerosas combinaciones teóricas entre los tres tipos de antígenos, tan solo algunas son

frecuentes entre las cepas patógenas (Orskov *et al.*, 1992; Blanco *et al.*, 2002) como *E. coli* O157:H7.

Para describir los numerosísimos serotipos de *E. coli* existentes, se ha diseñado una fórmula antigénica consistente en tres partes, que describen, por orden, el antígeno somático, el antígeno flagelar capsular y el antígeno flagelar (O: K: H). Estas tres partes se separan por dos puntos (:), p.e. el serotipo O2: K1:H6 causante de infecciones urinarias en perros.

○ **Tipificación por patrón de resistencia a antimicrobianos**

Es la clasificación de los aislados en función del patrón de sensibilidad o resistencia a los agentes antimicrobianos. La acción de dichos agentes debe estudiarse sobre cultivos *in vitro* del microorganismo en cuestión, y, con los datos obtenidos puede planificarse la posible utilidad terapéutica del producto ensayado.

Las técnicas utilizadas son la dilución en microplaca o la técnica de difusión en ágar (Barnes *et al.*, 2003; Biarnés, 2006), obteniéndose respectivamente datos de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) o de Diámetro de Halo de Inhibición (DHI).

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es la concentración mínima de un antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo *in vitro*. El Diámetro de Halo de Inhibición (DHI), es la medida (en milímetros) del halo de inhibición del crecimiento producido por un antimicrobiano concreto.

Actualmente hay una gran cantidad de resistencias, especialmente entre las cepas de origen animal y las causantes de infecciones nosocomiales. Por ello, casi siempre resulta necesario realizar un antibiograma para poder determinar a qué antimicrobiano es sensible o resistente la cepa aislada (Blanco *et al.*, 2002), de ello dependerá el éxito del tratamiento (Barnes *et al.*, 2003).

Pruebas de sensibilidad bacteriana *in vitro*:

- ♦ El método de difusión en ágar (Figura 9) es uno de los más utilizados (Amara *et al.*, 1995; Radu *et al.*, 2001; Miles *et al.*, 2006). Se desarrolló en la década de 1940 y utilizan discos de papel de filtro seco impregnados con concentraciones específicas de agentes antimicrobianos. Así, las bacterias se clasifican en sensibles, intermedias o resistentes a cada uno de los antimicrobianos probados. Para eliminar o reducir al mínimo la variabilidad de esta prueba, se desarrolló un procedimiento estándar en el que se seleccionó el medio ágar Mueller-Hinton como medio de cultivo (Radu *et al.*, 2001).

Figura 9. Prueba de sensibilidad bacteriana mediante el método de difusión en ágar.



Varias agencias reguladoras y organizaciones normativas publicaron más tarde procedimientos de referencia estándar basados en el método de Bauer-Kirby.

Entre los primeros y más ampliamente aceptados están los publicados por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA, 1972) y la OMS (Ericsson y Sherris, 1971). El procedimiento fue adoptado por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1997) denominado actualmente como *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2006) como forma de aceptación general, siendo actualizado periódicamente.

- ♦ Método de dilución en microplaca: son técnicas de dilución en medio líquido sobre placas con pocillos de fondo en “U”. Permite determinar la CMI, bien valorando el crecimiento bacteriano en los diferentes pocillos o por simple lectura a través de un visor invertido de espejo. Se trata de un método ampliamente utilizado (Van den Bogaard *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2005).

1.1.3.2.5. Medidas preventivas y tratamiento

Para prevenir la colibacilosis es imprescindible conocer y eliminar las fuentes de contaminación así como evitar factores predisponentes que contribuyan a la aparición de la enfermedad (Barnes *et al.*, 2003; Biarnés, 2006). Estos parámetros, cuando no son adecuados, tienen una gran repercusión en el bienestar animal e influyen negativamente en la producción, incrementando la susceptibilidad a las infecciones por *E. coli* (Blanco *et al.*, 1996a; 1998; La Ragione *et al.*, 2002). Las normas mínimas de protección de las gallinas ponedoras vienen detalladas en el RD 3/2002.

La prevención de la colibacilosis puede llevarse a cabo mediante el control y vigilancia de los siguientes factores fundamentales (Barnes *et al.*, 2003):

- ♦ Manejo: densidad de animales correcta, ventilación eficaz, ausencia de suciedad y polvo, retirada periódica de gallinaza, intensidad lumínica y temperaturas adecuadas, suministro de agua y pienso, programas de desinfección, desinsectación y desratización adecuados (Zhao *et al.*, 2005). El polvo con contaminación fecal se considera una de las principales vías de infección y diseminación de la enfermedad (Blanco *et al.*, 1996c).
- ♦ Profilaxis y estatus sanitario: debe minimizarse la incidencia de enfermedades como la coccidiosis, bronquitis infecciosa, Enfermedad de Newcastle, Gumboro, *M. gallisepticum*, *M. synoviae* y micosis (Brée *et al.*, 1989; Nakamura *et al.*, 1992; La

Ragione *et al.*, 2002; Mellata *et al.*, 2003) ya que son enfermedades que predisponen al desarrollo de la colibacilosis (Zhao *et al.*, 2005). Por tanto, los programas de vacunación deben ser los adecuados para la explotación.

Existen en el mercado distintas vacunas inactivadas frente a *E. coli* (Ceva, Hipra, Syva), pero es importante tener en cuenta que la vacuna sólo protege eficazmente frente a las cepas homólogas de *E. coli* y no frente a cepas heterólogas de otros serotipos, quizá debido al elevado número de serotipos existentes (Buxadé *et al.*, 2000; Biarnés, 2006). Se sugiere el empleo de una doble dosis en fase de recría para lograr una protección duradera, durante todo el periodo de puesta.

Debido a la problemática en cuanto al control de esta enfermedad mediante vacunación, se han realizado estudios de valoración de los antígenos óptimos para la elaboración de las vacunas, como adhesinas F1 y P, proteína receptora de aerobactina y lipopolisacáridos (LPS) obtenidos de la cepa *E. coli* O78, indicando su relevancia a la hora de proteger contra las infecciones del tracto respiratorio causada por cepas patógenas de *E. coli* (Kariyawasam *et al.*, 2002).

- ♦ Los programas de nutrición: es importante la aplicación de fórmulas nutricionales correctas para cada fase de producción, así como un buen suministro de pienso a los animales. Un suministro incorrecto del pienso podría provocar estrés en los animales favoreciendo la aparición de enfermedades. La realización de controles del pienso y materias primas es esencial para garantizar una buena calidad (Barnes *et al.*, 2003).
- ♦ La terapia antimicrobiana es una herramienta indispensable para reducir las importantes pérdidas ocasionadas por las infecciones por *E. coli* en la industria avícola (Amara *et al.*, 1995; Blanco *et al.*, 1997a; Zhao *et al.*, 2005).

E. coli posee la sensibilidad característica de las bacterias Gram negativas, siendo parte de las cepas sensibles a penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, colistina, sulfamidas, trimetoprim y quinolonas (Blanco *et al.*, 2002; Barnes *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que varios factores contribuyen a la virulencia de las cepas aviares de *E. coli*, y muchos se encuentran alojados en plásmidos de conjugación de gran tamaño. En ellos, también pueden encontrarse genes responsables de resistencias a

agentes antimicrobianos, y es posible que el uso de éstos seleccione de manera específica las cepas de *E. coli* que contienen estos plásmidos, aumentando así la persistencia de las mismas entre las aves (Johnson *et al.*, 2004).

Buxadé *et al.*, (2000) señala que los casos de colibacilosis suelen ser recurrentes y los lotes deben ser medicados con frecuencia a lo largo de su vida productiva. Aparentemente, según algunos autores, la utilización masiva de antimicrobianos junto con la práctica habitual de utilizarlos a concentraciones sub-inhibitorias con fines profilácticos, ha incrementado considerablemente las resistencias bacterianas (Ginns *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1996a; Vandemaele *et al.*, 2002; Barnes *et al.*, 2003; McPeake *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005; Ask *et al.*, 2006; Biarnés, 2006). Es decir, el empleo inadecuado de antibióticos podría considerarse como una importante fuente de emergencia, selección y diseminación de resistencias (Van den Bogaard *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2004; Schroeder *et al.*, 2004).

Según la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), la colistina registrada como Colivet® (CEVA), es el único agente antimicrobiano autorizado en avicultura de puesta frente a *E. coli*. También puede ser tratamiento de elección frente a *Salmonella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.

La colistina o polimixina E es un antibiótico polipeptídico derivado de *Bacillus colistinus*, compuesto hidrosoluble y estable en medios con pH ácido (Sumano y Ocampo, 2006). Actúa alterando la permeabilidad de la membrana celular de las bacterias, lo que origina una alteración de su metabolismo produciendo la muerte bacteriana. También actúa reduciendo la actividad de las endotoxinas bacterianas en los líquidos tisulares.

La utilización de antimicrobianos puede producir el efecto indeseado de seleccionar cepas bacterianas resistentes a los mismos, ya sean o no patógenas. Este fenómeno se puede producir sobre bacterias resistentes que de forma natural se encuentren en el medio antes de que se produzca el tratamiento antimicrobiano o bien porque se generan durante el proceso infeccioso y su tratamiento. Las bacterias responden ante la presión selectiva ejercida por los antibióticos de forma que en el nuevo ambiente sólo sobreviven los microorganismos más aptos en sentido evolutivo, es decir los más resistentes (Johnson *et al.*, 2004; Schroeder *et al.*, 2004).

Estas resistencias están codificadas y reguladas a nivel genético y por tanto son heredables. Además y debido a los mecanismos de transmisión y recombinación genética que poseen los procariotas, estos genes de resistencia pueden diseminarse horizontalmente a otras bacterias, multiplicando exponencialmente el riesgo de encontrar bacterias patógenas resistentes a los antibióticos en los animales y su entorno.

1.1.3.2.6. Mecanismos patogénicos: principales factores de virulencia en los aislados de *E. coli* aviaries

Los APEC están presentes en la microbiota normal del intestino, comportándose como patógenos oportunistas. Aprovechan períodos en los que las defensas de los animales se encuentran disminuidas para manifestar su acción patógena (Blanco *et al.*, 1996a, 1996c; Delicato *et al.*, 2003).

Existen atributos de virulencia en APEC que los diferencia de otros *E. coli* no patógenos, son los factores de virulencia que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad.

La virulencia de *E. coli* es multifactorial, es decir, depende de la acción combinada de numerosos factores o genes de virulencia (Nataro *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2002; Kariyawasam *et al.*, 2002; Siek *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2004). Estudios genéticos demuestran la presencia de numerosas recombinaciones y transferencia horizontal de genes, señalando una vez más, la gran diversidad de factores de virulencia (Eliora, 2006).

Algunos factores son más prevalentes en cepas patógenas de *E. coli* (Ewers *et al.*, 2004, 2005; Johnson *et al.*, 2006) pudiendo actuar como marcadores relativos de patogenicidad, permitiendo así detectar y caracterizar a las cepas patógenas. Por tanto, esta característica podría ser utilizada como herramienta en la prevención de la colibacilosis aviar (Dozois *et al.*, 2000; Pfaff-McDonough *et al.*, 2000; Janben *et al.*, 2001; Da Silveira *et al.*, 2002; La Ragione *et al.*, 2002; Delicato *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003; Skyberg *et al.*, 2003; Ewers *et al.*, 2005).

Los factores de virulencia pueden agruparse en función del papel que desempeñan en la patogénesis (Tabla 2).

Tabla 2. Principales grupos de genes de virulencia en APEC (modificada de Siek *et al.*, 2005b).

GENES	DESCRIPCION
Genes asociados a plásmidos	
<i>iss</i> **	Gen de la supervivencia aumentada en suero.
<i>iucC</i>	Gen del operón aerobactina.
<i>tsh</i>	Gen de la hemaglutinina termosensible.
<i>cvi</i> **	Gen de la inmunidad a Colicina V.
<i>iroN</i> *	Gen del receptor del sideróforo catecol.
<i>traT</i> **	Gen responsable de la resistencia al suero.
<i>iutA</i> *	Receptor para la aerobactina (sistema para la captación de hierro).
<i>sitA</i> *	Sistema de adquisición de hierro.
*	Asociado con sistemas de captación de hierro.
**	Podrían clasificarse como protectinas.
Genes relacionados con sistemas de captación de hierro	
<i>fyuA</i>	Sistema de captación de hierro mediado por yersiniabactina.
<i>irp-2</i>	Gen asociado a la síntesis del sideróforo yersiniabactina.
<i>ilreA</i>	Codifica una proteína responsable de la captación de hierro.
<i>feoB</i>	Gen implicado en la captación de hierro.
Adhesinas	
<i>afa</i>	Gen que codifica adhesinas afimbriales
<i>fim</i>	Gen que codifica fimbrias de tipo 1
<i>pap</i>	Gen que codifica fimbrias o <i>pili</i> tipo P (asociados a pielonefritis y cistitis)
<i>sfa</i>	Gen que codifica fimbrias tipo S
<i>focG</i>	Gen que codifica fimbrias tipo F1c (asociados a pielonefritis)
<i>gafD</i>	Gen que codifica fimbrias tipo G.
<i>bmaE</i>	Gen que codifica para adhesinas M
Toxinas	
<i>hly</i>	Codifica una proteína que regula la excreción de hemolisina.
<i>cdtB</i>	Codifica la toxina CDT.
<i>cnf-1</i>	Responsable de la producción del factor citotóxico necrosante.

Aunque todavía existen incógnitas acerca del papel exacto que desempeñan los factores de virulencia, hay multitud de referencias en las que se describen los mecanismos concretos y su importancia en el desarrollo de la colibacilosis (La Ragione *et al.*, 2002; Mellata *et al.*, 2003; Tivendale *et al.*, 2004). Ciertos factores se localizan en el cromosoma (Janben *et al.*, 2001; McPeake *et al.*, 2005a) como *fimC*, *papC*, responsables de factores de adhesión tipo 1 y fimbrias P. También los factores *irp2* y *fyuA*, responsables

de sistemas de captación de hierro y los factores *asta* y *vat*. Sin embargo, los factores considerados de mayor importancia por su mecanismo de acción son plasmídicos (plásmido pTJ100, ColV, etc.). Los factores *cvi*, *iss*, *tsh* e *iucD*, son un ejemplo de ellos (Da Silveira *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2004, 2006).

Gran parte de los estudios de caracterización de genes de virulencia en APEC, en los que se determina la presencia o ausencia de los mismos, incluyen genes como *iss*, *iuc*, *tsh* y *cvi* (Blanco *et al.*, 1996c; Knöbl *et al.*, 2001; La Ragione *et al.*, 2003).

Según la bibliografía consultada, estos factores se encuentran vinculados con la virulencia de los aislados clínicos y por este motivo, han sido seleccionados en este estudio. Además de estos cuatro factores de virulencia, se ha procedido a la determinación de *fimC*, perteneciente al grupo de las adhesinas y por tanto implicado en la capacidad adhesiva de *E. coli* al epitelio respiratorio de las aves; y de *fyuA*, relacionado con los sistemas de captación y liberación de hierro.

Siguiendo las indicaciones más relevantes halladas en la literatura sobre *E. coli* aviar, los factores de virulencia seleccionados serían aquellos cuya función juega un importante papel en la patogénesis de la colibacilosis aviar.

A continuación se detallan las principales características de los grupos a los que pertenecen los factores de virulencia estudiados.

1.1.3.2.6.1. Factores implicados en la capacidad adhesiva.

Es posible que se trate de la fase más importante en el desarrollo de las colisepticemias aviarias. La adherencia de *E. coli* a células del epitelio respiratorio de las aves se produce gracias a unos filamentos proteicos proyectados a lo largo de la superficie bacteriana denominados fimbrias o *pilli* (Blanco *et al.*, 2002; Ewers *et al.*, 2004; McPeake *et al.*, 2005).

La mayoría de las adhesinas posee la capacidad de hemaglutinar eritrocitos de diferentes especies animales (Blanco *et al.*, 2002) de modo independiente (específicas de cepas patógenas) o sensible a la manosa (suponen el 75% de las cepas de *E. coli* patógenas y otras no patógenas). Aunque se han descrito numerosos sistemas de adhesión en *E. coli*, únicamente detallaremos las más frecuentes en los aislados aviarios.

Las principales adhesinas identificadas en APEC son las fimbrias de tipo 1, (Delicato *et al.*, 2003) que se expresan cuando el patógeno se encuentra en el tracto respiratorio superior, pulmones y sacos aéreos de las aves infectadas (La Ragione *et al.*, 2003). Esto podría explicar su posible papel en los primeros estadios de la infección y su relación con la virulencia (Dozois *et al.*, 1994; Barnes *et al.*, 2003; Monroy *et al.*, 2003; Skyberg *et al.*, 2003). En cambio, las fimbrias P parece que juegan un papel más importante en fases avanzadas de la infección (Pourbakhsh *et al.*, 1997; La Ragione *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003b). Dozois *et al.*, (1995) comprobaron la inexistencia de receptores para fimbrias P en tráquea de pollos, por tanto, no se produciría su adhesión a nivel del tracto respiratorio superior. De este modo, se sugiere que podrían participar en la colonización de órganos internos favoreciendo el desarrollo de la septicemia (Pourbakhsh *et al.*, 1997).

Los APEC pueden expresar dos fimbrias tipo 1: tipo 1 y tipo 1-like. Comparten las siguientes características (Blanco *et al.*, 1996a):

1. Se adhieren *in vivo* e *in vitro* a células del epitelio respiratorio de pollos y pavos.
2. Hemaglutinan eritrocitos de cobaya de forma sensible a la manosa.
3. Están constituidas por cientos de subunidades estructurales repetitivas de peso molecular parecido (17-19 KD), gran homología en su secuencia aminoacídica y comparten epitopos responsables de sus relaciones inmunológicas.
4. Presentan unas subunidades menores de 29 KD, idénticas estructural e inmunológicamente, situadas en la punta de los filamentos rectilíneos fimbriales y actúan como adhesinas entrando en contacto directo con los receptores celulares.

Otro tipo de adhesinas sin actividad hemaglutinante son las descritas por Yerushalmi *et al.*, (1990) como AC/I. Constituyen un subgrupo dentro del grupo de las fimbrias S y fomentan la adherencia de *E. coli* al epitelio intestinal y a las células traqueales (Delicato *et al.*, 2003; McPeake *et al.*, 2005).

1.1.3.2.6.2. Factores implicados es los sistemas de captación y liberación de hierro

El hierro resulta limitante para el crecimiento bacteriano. Su baja concentración se debe a que un gran porcentaje se encuentra secuestrado en hemoproteínas o en proteínas

quelantes del hierro relacionadas con su transporte, como la transferrina o la lactoferrina (Blanco *et al.*, 1996a).

Para la obtención del hierro, los *E. coli* aviares cuentan con sistemas de captación como los mediados por el sideróforo aerobactina (Delicato *et al.*, 2003; Monroy *et al.*, 2003; Ewers *et al.*, 2004; McPeake *et al.*, 2005) gracias al cual capta y concentra el hierro libre. Se trata de un factor claramente vinculado con la virulencia de los aislados (Bolin *et al.*, 1986; Skyberg *et al.*, 2003).

Otro sistema de adquisición de hierro es el mediado por yersiniabactinas. En *E. coli*, los genes responsables de estos sistemas de incorporación forman parte de una isla de patogenicidad adquirida mediante transferencia horizontal (Rakin *et al.*, 1995). Este hecho ha sido demostrado en humanos y en aves (Schubert *et al.*, 1998, Janssen *et al.*, 2001).

1.1.3.2.6.3. Factores implicados en la supervivencia aumentada en el suero

Numerosos estudios hacen referencia a la correlación positiva entre la supervivencia aumentada en suero y la virulencia, demostrando la importancia de la presencia del gen *iss* en las cepas patógenas de *E. coli* (Ellis *et al.*, 1988; Ferreira y Silva, 1991; Wooley *et al.*, 1992, 1993; Nolan *et al.*, 1992a, 1992b; Ptiff-McDonough *et al.*, 2000; Barnes *et al.*, 2003; Delicato *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003a; Skyberg *et al.*, 2003; McPeake *et al.*, 2005). Se trata de un factor frecuentemente detectado en aislados patógenos de origen aviar (Vandekerchove *et al.*, 2005).

Tras los primeros estadios de la infección, *E. coli* llega al torrente circulatorio y es en esta localización donde debe resistir a la actividad lítica del complemento sérico. Se cree que a esta resistencia contribuyen algunos antígenos (O y K) y determinadas proteínas presentes en la membrana externa de la pared celular bacteriana (Blanco *et al.*, 1996a; Monroy *et al.*, 2003).

1.1.3.2.6.4. Producción de colicinas

Las colicinas son sustancias producidas por algunas cepas de *E. coli* que resultan tóxicas para otras cepas de la misma especie e inhiben su crecimiento por competencia (Blanco *et al.*, 2002). Por tanto, es posible que las cepas patógena productoras de colicinas pudieran tener una mayor persistencia que las cepas avirulentas (Barnes *et al.*, 2003).

La presencia de este factor se consideraría como un indicador de virulencia (Delicato *et al.*, 2003; Vandekerchove *et al.*, 2005). En un estudio realizado con aislados de *E. coli* en Brasil comprobaron que el 89% de las cepas patógenas producían colicinas, frente al 11% de las cepas no letales (Blanco *et al.*, 1996a).

1.1.3.2.6.5. Actividad hemaglutinantetermosensible

El gen responsable, *tsh* (*temperature sensitive hemagglutination*), se detecta mayoritariamente en los aislados patógenos de *E. coli* y raramente en los saprofitos (Blanco *et al.*, 2002; Delicato *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003; Skyberg *et al.*, 2003; McPeake *et al.*, 2005; Vandekerchove *et al.*, 2005). La actividad hemaglutinante se realiza a baja temperatura (26-30°C) y se inhibe a 42°C, de aquí su nombre (Provence *et al.*, 1994; La Ragione, 2002).

Estudios realizados por Maurer *et al.*, (1998), demostraron la presencia del gen *tsh* en el 46% de los aislados clínicos de origen aviar y su ausencia en los aislados obtenidos a partir de animales sanos. Dho-Moulin *et al.*, (1998) demostraron que entre todos los aislados *tsh* positivos, el 91% eran patógenos.



OBJETIVOS

En este estudio nos propusimos determinar, como objetivo general, las características diferenciales de los aislados clínicos y fecales de *E. coli* responsables de la colibacilosis en gallinas ponedoras. Para ello, nos marcamos los siguientes objetivos específicos:

1. Elaboración y seguimiento de un programa de recogida de muestras para maximizar la eficiencia en el aislamiento de *E. coli* en animales con sintomatología y lesiones compatibles con colibacilosis, y desarrollar un estudio comparativo entre ambos tipos de muestras.
2. Procesamiento de las muestras mediante los sistemas de aislamiento e identificación bioquímica de *E. coli* establecidos en nuestro laboratorio. Análisis estadístico de los resultados y de las diferencias halladas entre los distintos orígenes de las muestras mediante el test de Fisher.
3. Determinación del perfil de sensibilidad al antimicrobiano colistina en los aislados clínicos.
4. Análisis de la detección de factores de virulencia mediante PCR: frecuencia de detección de cada uno de los factores independientes, cuantificación y posibles correlaciones (agrupamiento por patotipos), tanto en aislados clínicos como fecales y su posterior estudio comparativo.
5. Determinación del serogrupo (antígenos somáticos) en aislados clínicos. Establecimiento de posibles correlaciones entre los serogrupos y los patotipos detectados en aislados clínicos.
6. Caracterización molecular de los aislados clínicos y fecales mediante la técnica de Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE). Posibles correlaciones entre los pulsotipos con los serogrupos y patotipos detectados en aislados clínicos.
7. Estudio de los brotes de colibacilosis mediante las técnicas de PCR, determinación del antígeno somático y PFGE.



MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. PROTOCOLO DE AISLAMIENTO

3.1.1. Muestras estudiadas

Para la realización del presente trabajo se analizaron muestras procedentes de órganos internos de gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus*, que, en todos los casos, presentaban lesiones compatibles con colibacilosis. También se analizaron muestras de origen fecal de animales aparentemente sanos (hisopos cloacales, muestras de gallinaza y heces de matadero). Todas las muestras, a excepción de las procedentes de matadero, fueron tomadas de granjas avícolas de producción de huevos situadas en la Comunidad Autónoma de Castilla La Mancha.

3.1.1.1. Condiciones de muestreo

Para la obtención de las muestras incluidas en este estudio fue preciso establecer contacto con granjas avícolas de producción de huevos. Tras la explicación de los objetivos del estudio, los protocolos e instrucciones tanto de recogida como de envío de las muestras al laboratorio, se solicitó su colaboración a la hora de remitirnos las muestras o de permitirnos ir personalmente a tomarlas.

Se hizo especial hincapié en la remisión de las muestras, a ser posible, el mismo día de su toma. En caso contrario, se almacenarían en refrigeración a 4°C hasta su envío al laboratorio, como máximo 48 horas tras la toma de la muestra.

Además, se les solicitó cumplimentar un pequeño cuestionario para recabar información sobre cada animal muestreado. La Figura 10, reproduce el modelo empleado, en el que se solicitaba información sobre el animal, condiciones de alojamiento, su estado sanitario, posibles tratamientos administrados, sintomatología observada, si se trataba de un brote o un caso aislado y el órgano de procedencia de la muestra.

A cada animal muestreado se le asignaba un número de referencia, correlativo, que se hacía constar tanto en el cuestionario como en la muestra.

El muestreo no puede considerarse aleatorio, sino por conveniencia, ya que ha dependido exclusivamente de muestras que pudieran facilitarnos, así como de muestras recogidas por nosotros mismos. En cualquier caso, siempre han sido tomadas a partir de brotes de la enfermedad.

La recepción y el procesado de muestras abarcaron el periodo de tiempo comprendido entre febrero de 2003 y septiembre de 2006.

Figura 10. Cuestionario utilizado en la recogida de muestras.

Remitente:	Explotación:
Localización:	Código explotación:
Nave/lote:	Edad animal:
Identificación del animal:	Alojamiento: Suelo <input type="checkbox"/> Jaula <input type="checkbox"/> Jaula enriquecida <input type="checkbox"/>
Fecha de recogida:	Fecha de envío de las muestras:
Broiler <input type="checkbox"/> Recría <input type="checkbox"/> Puesta <input type="checkbox"/> Reproductoras <input type="checkbox"/>	
MUESTRAS REMITIDAS: ÓRGANOS: Pulmón-Sacos aéreos: () Hisopo <input type="checkbox"/> () Contenedor estéril <input type="checkbox"/> Hígado: () Hisopo <input type="checkbox"/> () Contenedor estéril <input type="checkbox"/> Otros: Ovario-Oviducto: () Hisopo <input type="checkbox"/> () Contenedor estéril <input type="checkbox"/> Corazón: () Hisopo <input type="checkbox"/> () Contenedor estéril <input type="checkbox"/>	
Brote <input type="checkbox"/> Caso aislado <input type="checkbox"/> Sintomatología observada:	LESIONES:
Vacuna <i>E. coli</i> y dosis:	
Edad de vacunación:	
Tratamientos (pienso, agua, inyectable):	
Observaciones:	

3.1.1.2. Toma de muestras

○ Muestras clínicas

Para el desarrollo de este estudio se requería, en primer lugar, la obtención de muestras clínicas de animales con sospecha de colibacilosis.

Las granjas de producción avícola se ponían en contacto con nuestro laboratorio informándonos de la sospecha (por la sintomatología observada, por un incremento de la mortalidad, etc) de un brote clínico de colibacilosis y se procedía a la toma de muestras.

Tras sacrificar humanitariamente a los animales, mediante dislocación de las vértebras cervicales, se realizó la necropsia y toma de muestras. En ningún caso se tomaron muestras a partir de animales encontrados muertos, debido a la posible diseminación bacteriana extraintestinal a los distintos órganos y su consiguiente contaminación secundaria. Una vez terminada la necropsia, se valoraban las lesiones observadas y se procedía a la toma de muestras para la realización del aislamiento de *E. coli* patógenos. El material empleado para enviar las muestras al laboratorio, fueron hisopos estériles con vástago de plástico y con medio de transporte Amies, distribuidos por Nessler.

Para llevar a cabo la toma de muestras se siguieron los protocolos de necropsia descritos en distintos manuales de avicultura (Maladies des Volailles, 2001; Saif *et al.*, 2003; Higiene y Patología Aviaries, Real Escuela de Avicultura, 2006).

Para el estudio, siempre se tomaron muestras de órganos que presentaran lesiones compatibles con colibacilosis. Las lesiones más frecuentemente observadas fueron: perihepatitis, pericarditis, salpingitis, ovaritis y peritonitis.

Las muestras se procesaban el mismo día de la toma, y de no ser posible, se almacenaban en refrigeración a 4°C hasta su envío al laboratorio, en un periodo máximo de 48 horas.

- **Muestras fecales**

Los sistemas de recogida de muestras fecales fueron los siguientes:

1. Muestras de gallinaza recogidas en naves de puesta

Se define gallinaza como un subproducto muy heterogéneo formado por heces, plumas, descamaciones y pienso de las gallinas. El sistema de recogida en las naves se lleva a cabo mediante un sistema de cintas situadas bajo las jaulas donde se encuentran los animales. Estas cintas recorren longitudinalmente las naves terminando por depositar la gallinaza en una cinta transversal a todas las naves que finaliza en un almacén donde se acumula hasta su retirada.

Las muestras de gallinaza utilizada para este estudio fueron tomadas del final de las cintas recolectoras mediante una espátula depresora de madera estéril (Nessler). Se introdujeron en recipientes estériles de 100 ml de volumen (J. D. Catalán, S.L.) distribuido por Lab-Center. Cada uno de los recipientes se identificó con el nombre y número de la nave de donde se habían tomado, así como la fecha de su recogida.

2. Hisopos cloacales

Para tomar este tipo de muestra se introducía un hisopo por el orificio cloacal de la gallina, de donde se recogía la muestra.

El material empleado eran hisopos con vástago de plástico y con medio de transporte Amies, distribuido por Nessler.

3. Muestras de heces tomadas en mataderos

Las muestras de heces procedentes de los mataderos fueron paquetes intestinales (tomadas desde los meses de marzo a diciembre de 2003) de siete mataderos distintos y

siempre se tomaron muestras de tres animales de cada partida de sacrificio. El número de muestras procedentes de matadero abarca 79 explotaciones comerciales diferentes.

Una vez tomadas las muestras, fueron remitidas al laboratorio en refrigeración (4°C) en un periodo de tiempo inferior a 24 horas desde el momento de su recogida hasta su procesamiento.

3.1.1.3. Muestras procesadas

○ Muestras clínicas

Se estudiaron un total de 33 brotes clínicos diferentes; los órganos procesados presentaban lesiones compatibles con colibacilosis en todos los casos. Se analizaron 238 animales de los que obtuvimos y procesamos 238 muestras de órganos. Cada muestra se correspondía con un animal diferente (Tabla 3):

Tabla 3. Relación del número de muestras clínicas analizadas

ORIGEN DE LA MUESTRA CLÍNICA	NÚMERO DE MUESTRAS ANALIZADAS
Hígado	82
Peritoneo	78
Pulmón	32
Ovario	22
Pericardio	20
Bazo	2
Médula ósea	1
Riñón	1
TOTAL	238

○ Muestras fecales

Se procesaron muestras de heces de animales aparentemente sanos. El origen de las muestras fue el siguiente: 28 hisopos cloacales de animales diferentes, 36 contenedores de gallinaza procedentes de naves en producción sin casos de colibacilosis y 79 muestras de heces tomadas en matadero (Tabla 4).

Tabla 4. Relación del número de muestras fecales analizadas

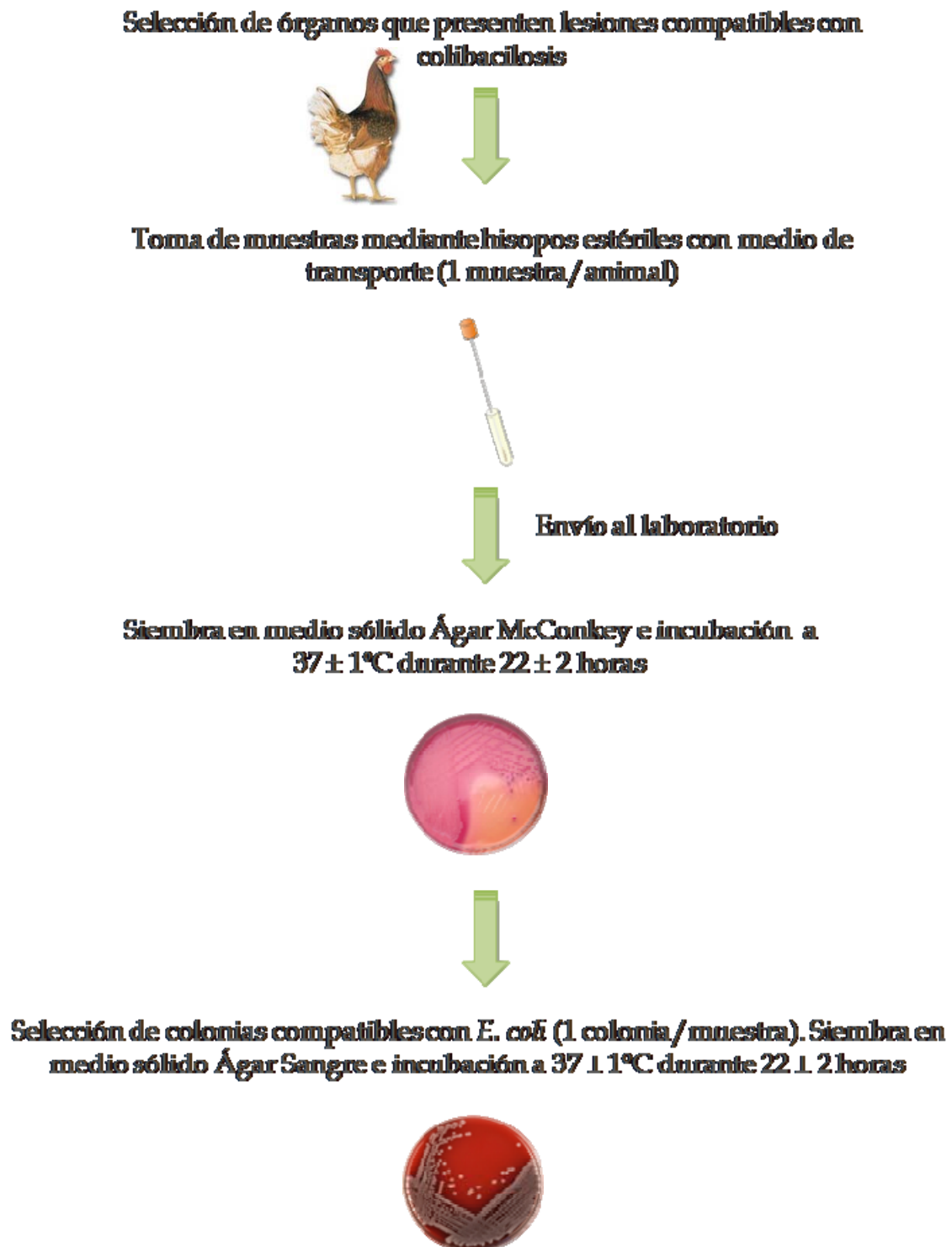
ORIGEN DE LA MUESTRA FECAL	NÚMERO DE MUESTRAS ANALIZADAS
Heces tomadas en matadero	79 mezclas (procedentes de 237 muestras)
Gallinaza de naves de puesta	36
Hisopos cloacales	28
TOTAL	143

3.1.2. Procesamiento de las muestras

3.1.2.1. Muestras clínicas

Una vez que las muestras recogidas se recibían en el laboratorio, se procesaban el mismo día de su llegada siguiendo el procedimiento específico PE/021/ICM registrado en el sistema de calidad del Laboratorio de Vigilancia Sanitaria, para la realización del ensayo **“Investigación de *E. coli* en muestras de origen aviar”** y cuyo esquema se muestra en la siguiente figura (Figura 11).

Figura 11. Protocolo de aislamiento microbiológico de *E. coli* a partir de las muestras analizadas.



El protocolo de aislamiento microbiológico aplicado a las muestras fue el siguiente:

- Siembra de los hisopos tomados en medios de cultivo sólidos, selectivos y cromogénicos (Ágar McConkey, bioMérieux) e incubación de las placas en atmósfera de aerobiosis a una temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 22 ± 2 horas.
- Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la selección de colonias sospechosas. Seleccionamos una colonia por muestra y se resembró en medio de cultivo sólido general Ágar Sangre + 5% de sangre de cordero (bioMérieux), para la obtención de cultivos puros. Estas placas se incubaron a una temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 22 ± 2 horas en una atmósfera de aerobiosis.

Es importante señalar que sólo los aislamientos de *E. coli* obtenidos en cultivos puros se tuvieron en cuenta para este trabajo de investigación.

A continuación, se procedió a la identificación bioquímica de las colonias susceptibles de pertenecer al género *Escherichia* (ver apartado 3.2.1.).

3.1.2.2. Muestras fecales

○ Muestras de gallinaza tomadas en naves de puesta e hisopos cloacales

Las muestras fueron remitidas al laboratorio siendo procesadas el mismo día de su recepción. El protocolo de aislamiento microbiológico fue el mismo que el descrito para el procesamiento de las muestras clínicas.

○ Muestras de heces tomadas en mataderos.

Se procesaron un total de 237 muestras de paquetes intestinales. Las muestras se recibieron refrigeradas y después de anotar la información de referencia, se pesaron cinco gramos de heces que se homogenizaron en bolsa de Stomacher con 45 ml de agua de peptona tamponada estéril.

A partir de estas suspensiones se prepararon las muestras de trabajo, denominadas “muestra agregada”, compuestas por volúmenes iguales de las tres muestras correspondientes a la misma partida de sacrificio.

Se obtuvieron un total de 79 muestras agregadas, que fueron analizadas siguiendo el protocolo de aislamiento microbiológico descrito para el procesamiento de las muestras clínicas.

3.1.2.3. Criterios para la selección de las colonias.

La selección de los aislados se realizó basándose en las características morfológicas y especialmente en la distinta coloración, que presentaban las colonias en el medio sólido cromogénico empleado. En todos los casos, se seleccionó una única colonia por muestra procesada.

El Ágar McConkey® (bioMérieux), es un medio de cultivo sólido, selectivo (para el crecimiento de bacterias Gram negativas) y diferencial. Contiene sales biliares, cristal violeta (para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas), rojo neutro (indicador de pH), lactosa, peptona.

Su acción diferencial está basada en que los microorganismos capaces de hidrolizar la lactosa (lactosa positivas, por ejemplo *E. coli*), liberan productos ácidos y por lo tanto se produce una disminución del pH del medio, que se puede observar gracias a la absorción del colorante, rojo neutro, apareciendo en la colonia el color rojo (Figura 12). Las colonias de microorganismos que no hidrolizan la lactosa permanecen incoloras (bacterias lactosa negativas, por ejemplo *Salmonella*, *Shigella*).

Figura 12. Morfología de colonias lactosa positivas en medio sólido Ágar McConkey



3.1.2.4. Conservación de los aislados obtenidos.

Tras la identificación bioquímica (ver punto 3.2.1.), todos los aislados identificados como *E. coli* se conservaron en medio de congelación, a $-20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Medio de congelación:

Caldo triptona (Oxoid).....	10 g
Leche descremada en polvo.....	20 g
Glicerina (Panreac).....	80 ml
Agua destilada.....	320 ml

En primer lugar, se esterilizaron (a una temperatura de $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos) los tubos vacíos que se emplearon posteriormente para introducir el medio de congelación. A continuación, una vez pesados todos los componentes del medio y

disueltos por agitación, se distribuyó el medio en los tubos estériles en volúmenes de 1,5 ml y se esterilizó el medio de congelación ya entubado a una temperatura de $110 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 minutos.

Para la conservación de los aislados se partía de cultivos puros tras 22 ± 2 horas de incubación en Ágar Sangre a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. A cada uno de los aislados se le identificó con el número de referencia correlativo que se adjudicaba a las muestras según su llegada al laboratorio.

3.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS

3.2.1. Identificación bioquímica

La identificación a nivel de especie de las cepas presuntivas de pertenecer al género *Escherichia* se determinó mediante la realización de una batería de pruebas bioquímicas específicas en tubo (Thampuran *et al.*, 2005). El conjunto de estas pruebas bioquímicas recibe el nombre de método IMVIC y engloba las siguientes pruebas:

- Producción de indol.
- Utilización del citrato como única fuente de carbono.
- Rojo de metilo.
- Prueba de la acetoína (Voges Proskauer).

El fundamento de cada una de estas pruebas, así como la preparación de los medios y la técnica a seguir para su realización se llevó a cabo siguiendo las pautas indicadas por Barrow *et al.*, 1993.

Los resultados esperados para la identificación de *E. coli* son: Indol (+), Citrato (-), Rojo de metilo (+) y Voges Proskauer (-).

3.2.2. Determinación del antígeno somático

La determinación del antígeno somático “O” se realizó en la totalidad de aislados clínicos, mediante la técnica de aglutinación en placa, siguiendo las pautas descritas por el laboratorio proveedor de los sueros, *Statens Serum Institut* (SSI), *Copenhagen (Denmark)* (www.ssi.dk). En general, los protocolos empleados para la determinación del antígeno somático en *E. coli* se basan en el originalmente descrito por Guinée *et al*, 1972 (Vandekerchove *et al.*, 2004c).

3.2.2.1. Materiales

○ Medios

1. Medio líquido *Brain heart infusión* (BHI), Difco, medio comercial, deshidratado, preparado según las instrucciones facilitadas por el fabricante. Una vez preparado se dispensó en tubos de vidrio a razón de 9 ml en cada uno y se procedió a su esterilización en autoclave a una temperatura de $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.
2. Solución salina estéril (bioMérieux).

○ Sueros

Para la selección de los sueros a emplear en la determinación del antígeno somático O, nos basamos en el panel propuesto por el Laboratorio de Referencia de *E. coli* de Lugo (LREC) como los más frecuentes y habituales en los aislados patógenos de origen aviar (Tabla 5). Son sueros comerciales policlonales somáticos (O) polivalentes y monovalentes (adquiridos en el SSI).

Tabla 5. Relación de sueros utilizados en la determinación del antígeno somático

SUEROS POLIVALENTES (POOL)	SUEROS MONOVALENTES
1	O103
2	O2, O5, O8
4	O88
5	O15, O45
6	O132
8	O1, O2, O6, O15, O18ac
9	O9, O12, O17, O8
10	O8, O45
11	O11, O20, O78
12	O115
14	O18ab, O35, O83, O116
15	O9, O5, O8, O15, O20
16	O14
17	O36
18	O53
20	O81
21	O102

○ **Utensilios de laboratorio**

- Guantes de latex (SemperCare).
- Asas de siembra estériles de 10 µl de capacidad.
- Pipetas multidispensadoras con un rango de volumen de 20-200 µl (Biohit).
- Puntas con filtro estériles para pipetas multidispensadoras con un rango de volumen de 20-200 µl (Sorenson, BioScience, Inc).
- Microplacas de aglutinación de 96 pocillos con el fondo redondeado (Deltalab).

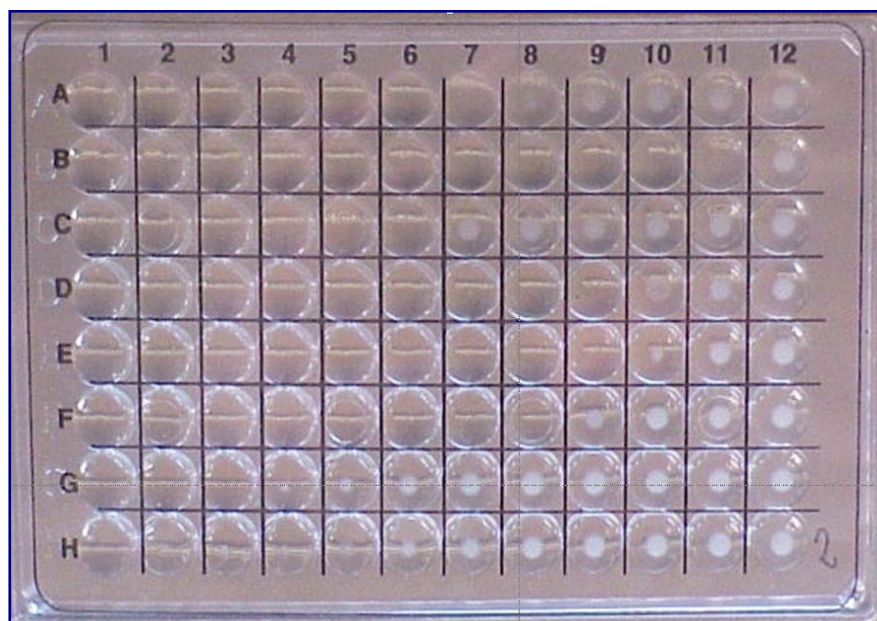
3.2.2.2. Procedimiento para la realización de la aglutinación en microplaca

1. Mediante un asa de siembra estéril se tomó una única colonia de *E. coli* aislada en medio sólido Ágar Sangre, se inoculó en un tubo con 9 ml de BHI estéril y se incubó a una temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 22 ± 2 horas. Transcurrido este tiempo se procedió al hervido de los tubos inoculados en un baño térmico a 100°C durante una hora.

2. Una vez realizado el paso anterior, se dejaron enfriar y reposar los tubos para que todos los componentes celulares lisados por el hervido sedimentaran y no interfirieran en la reacción de aglutinación.

3. Sueros polivalentes: para un aislado, se añadieron en 17 pocillos de la microplaca 50 μl del sobrenadante de la suspensión bacteriana y luego, en cada uno de ellos, se añadieron 50 μl de cada uno de los sueros polivalentes. Se incubó la microplaca a $50-52 \pm 1^\circ\text{C}$ en atmósfera húmeda durante 22 ± 2 horas. Como control negativo se añadió en otro pocillo 50 μl de la suspensión bacteriana junto con 50 μl de solución salina estéril.

Figura 13. Microplaca utilizada en la determinación del antígeno somático.



4. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la valoración de la aglutinación: consideramos aglutinación positiva cuando en el pocillo se creaba una malla tridimensional que se veía a simple vista, como una turbidez, y aglutinación negativa cuando se producía la sedimentación de los componentes formándose un “botón blanco” en el fondo del pocillo, indicando así la inexistencia de complejos antígeno-anticuerpo.

5. Una vez determinado el suero polivalente con el que la aglutinación era positiva, se procedía a probar con todos los sueros monovalentes incluidos dentro de ese polisero, hasta encontrar aquel con el que reaccionaba, dando lugar a una aglutinación.

Si el control negativo presentaba una aglutinación positiva se consideraba como una cepa autoaglutinante, por tanto no tipable (NT). La aglutinación definitiva se obtiene cuando una cepa aglutina claramente con un único antisuero monovalente.

En el caso de que los aislados no aglutinaran con ninguno de los sueros incluidos en el estudio, se consideraba como serogrupo no determinado (ND).

3.3. DETECCIÓN DE FACTORES DE VIRULECIA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un procedimiento rápido para la amplificación *in vitro* de segmentos específicos de ADN situados entre dos regiones cuyas secuencias son conocidas.

Actualmente su uso está muy extendido debido, principalmente, a su sencillez, automatización, tiempo de análisis reducido, reproducibilidad, sensibilidad y especificidad.

En el caso de nuestro estudio, y basándonos en la gran especificidad de esta técnica, utilizamos tres PCRs diferentes, a partir de una colonia, para determinar la presencia o ausencia de seis de los principales factores de virulencia en aislados de *E. coli* tanto en muestras clínicas (aves con lesiones compatibles de colibacilosis) como en muestras de cloaca y de heces.

3.3.1. Extracción del ADN cromosómico

Partiendo de cultivos puros de 22 ± 2 horas de incubación en Ágar Sangre + 5% de sangre de cordero, procedimos a realizar la extracción del ADN cromosómico mediante la técnica de lisis de las células por hervido (Rodríguez-Angeles, 2002; Delicato *et al.*, 2003; Ewers *et al.*, 2005; McPeake *et al.*, 2005; Siek *et al.*, 2005; Dho-Moulin *et al.*, 2006; Queipo-Ortuño *et al.*, 2007). Para ello, se tomó una colonia y se resuspendió en 100 μ l de H₂O bidestilada estéril, la mezcla se hirvió en un baño termostático a $100 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 minutos.

3.3.2. Elección de los oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos de las distintas PCR empleados en este estudio fueron seleccionados a partir de la bibliografía consultada. Las referencias se detallan a continuación en cada una de las tres reacciones puestas a punto.

- **PCR múltiple para la determinación de los factores de virulencia *iss*, *iucC*, *tsh* y *cvi***

Estos factores fueron seleccionados por su elevada correlación con la virulencia. La presencia o ausencia de estos factores se determinó mediante la aplicación de la PCR descrita previamente por Skyberg *et al.*, (2003).

Estos factores de virulencia no han sido detectados en las otras especies de bacterias utilizadas como control negativo, lo que demuestra la especificidad del procedimiento para los aislados de *E. coli*. Estos resultados sugieren que este protocolo puede ser útil en la caracterización y estudio de las cepas aviarias de *E. coli* (Skyberg *et al.*, 2003).

Para llevar a cabo la puesta a punto de esta técnica, se realizaron algunas modificaciones en las condiciones de PCR (ver apartado 3.3.3.). Las secuencias de los oligonucleótidos y el tamaño de los fragmentos amplificados se muestran en la siguiente tabla (Tabla 6).

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en la PCR múltiple

Oligonucleótidos	Secuencias (5' - 3')	PCR Amplicón
<i>iss</i> up <i>iss</i> do	GTGGCGAAAAGTAGTAAAACAGC CGCCTCGGGGTGGATAA	760 pb
<i>iucC</i> up <i>iucC</i> do	CGCCGTGGCTGGGGTAAG CAGCCGGTTCACCAAGTATCACTG	541 pb
<i>tsh</i> up <i>tsh</i> do	GGGAAATGACCTGAATGCTGG CCGCTCATCAGTCAGTACCAC	420 pb
<i>cvi</i> up <i>cvi</i> do	GGGCCTCCTACCCCTTCACTCTTG ACGCCCTGAAGCACCACCAGAA	366 pb

- **PCR para la determinación del factor de virulencia *fimC***

La presencia o ausencia del factor *fimC* se determinó mediante la aplicación de la PCR descrita previamente por Ewers *et al.*, (2004). Las secuencias del oligonucleótido y el tamaño del fragmento amplificado de esta PCR se muestran a continuación (Tabla 7).

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en la determinación del factor *fimC* por PCR

Oligonucleótidos	Secuencias (5' - 3')	PCR Amplicón
<i>fimC</i> up <i>fimC</i> do	GGGTAGAAAATGCCGATGGTG CGTCATTTTGGGGGTAAGTGC	497 pb

- **PCR para la determinación del factor de virulencia *fyuA***

La presencia o ausencia del factor *fyuA* se determinó mediante la aplicación de la PCR descrita por Ewers *et al.*, (2004). Las secuencias del oligonucleótido y el tamaño del fragmento amplificado se muestran a continuación (Tabla 8).

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados en la determinación del factor *fyuA* por PCR

Oligonucleótidos	Secuencias (5' - 3')	PCR Amplicón
<i>fyuA</i> up <i>fyuA</i> do	GCGACGGGAAGCGATGACTTA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	774 pb

Todos los oligonucleótidos empleados en las PCRs, fueron sintetizados en Roche Diagnostics, S.L.

Las cepas de *E. coli* utilizadas como controles positivos (Tabla 9) en nuestro estudio, fueron cedidas por la Dra. Lisa K. Nolan, del Departamento de Microbiología Veterinaria y Medicina Preventiva, *Iowa State University, (USA)*.

Tabla 9. Relación de cepas de *E. coli* empleadas como control positivo

REFERENCIA CEPA	FACTORES DE VIRULENCIA					
	<i>iss</i>	<i>Iuc</i>	<i>tsh</i>	<i>cvi</i>	<i>fimC</i>	<i>fyuA</i>
2363	+	+	+	+	+	+
V2	+	+	+	+	+	+
V1	+	+	+	+	+	-
V6	+	+	-	-	+	+
V3	+	-	-	+	+	-
V4	+	-	-	+	+	-
A6	-	-	-	+	+	-
A1	-	-	-	+	+	-
A3	-	+	-	-	+	-
A4	-	-	-	-	+	-

3.3.3. Reacciones de PCR

- **PCR múltiple para la determinación de los factores de virulencia *iss*, *iucC*, *tsh* y *cvi***

El volumen final de la PCR fue de 50 µl, aunque algunas de las condiciones fueron modificaciones a partir de las indicaciones de la bibliografía. Estas fueron las siguientes: la extracción de ADN cromosómico se realizó mediante lisis de células por hervido durante 10 minutos (min) y la concentración de dNTP's fue de 10 mM, por lo que la cantidad utilizada en el mix de PCR fue de 0,8 µl por muestra.

Por lo tanto, la composición final es la que se detalla a continuación:

- 5 µl del lisado obtenido en el apartado 3.3.1.
- 5 µl de Buffer de PCR 10x, (Tris HCl 75 mM, pH 9, KCl 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 20mM). (BIOTOOLS).
- 6 µl de solución de cloruro de magnesio (MgCl₂ 50 Mm, BIOTOOLS).
- 0,8 µl de la mezcla de dNTP's (250 µl premezclados a 10 mM, BIOTOOLS).
- 0,3 µl del oligonucleótido *iss* a una concentración de 100 µM (100 pmol/µl, Roche Diagnostics, S.L.).
- 0,1 µl de los oligonucleótidos *iucC*, *tsh* y *cvi* a una concentración de 100 µM (100 pmol/µl, Roche Diagnostics, S.L.).
- 0,3 µl de ADN polimerasa (Concentración: 5U/µl, BIOTOOLS).
- 31,7 µl de agua bidestilada estéril.

Las condiciones del termociclador también fueron modificadas: la desnaturalización inicial se llevó a cabo a una temperatura de 95°C durante 5 min, seguida de 29 ciclos de amplificación consistentes en: desnaturalización a 95°C durante 1 min, hibridación a 72°C durante 1 min, elongación a 72°C durante 1 min. Por último se realizó una elongación final de 7 min a 72°C.

- **PCR para la determinación del factor de virulencia *fimC***

Se realizó en un volumen final de 25 µl y su composición fue:

- 2 µl del lisado obtenido en el apartado 3.3.1.
- 2, 5 µl de Buffer de PCR 10x (Tris HCl 75 mM, pH 9, KCl 50 mM, (NH₄)₂ SO₄ 20mM) (BIOTOOLS).
- 1 µl de solución de cloruro de magnesio (MgCl₂ 50 Mm, BIOTOOLS).
- 0,5 µl de la mezcla de dNTPs (250 µl premezclados a 10 mM, BIOTOOLS).

- 0,1 µl del oligonucleótido *fimC* a una concentración de 100 µM (100 pmol/µl, Roche Diagnostics, S.L.).
- 1 µl de ADN polimerasa (Concentración: 1U/µl, BIOTOOLS).
- 17,8 µl de agua bidestilada estéril.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: fase de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguida de 25 ciclos de amplificación consistentes en: desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación durante 1 min a una temperatura de 59°C y elongación a 72°C durante 90 segundos. Por último, se realizó una fase de elongación final de 7 min a 72°C.

- **PCR para la determinación del factor de virulencia *fyuA***

El volumen y la composición de la reacción de PCR fueron idénticos a la PCR descrita para la determinación del factor de virulencia *fimC*, excepto en oligonucleótido utilizado: 0,1 µl del oligonucleótido *fyuA* a una concentración de 100 µM (100 pmol/µl, Roche Diagnostics, S.L.).

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: fase de desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguida de 25 ciclos de amplificación consistentes en: desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación durante 1 min a una temperatura de 65°C y elongación a 72°C durante 1 min. Por último, se realizó una fase de elongación final de 7 min a 72°C.

Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador modelo Mastercycler personal (Eppendorf).

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1x utilizando 80µl/ml de IQ™ Sybersafe (Invitrogen, ref: S33102) para teñir el ADN y como marcador de peso molecular se utilizó 100 pb Ladder Biotools (B&M Laboratorios, S.A., Madrid).

3.4. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO (PFGE)

3.4.1. Principio de la técnica

La electroforesis de campo pulsado (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) es un sistema de tipado genético que se basa en el análisis del ADN cromosómico. Se define REDP (*Restriction Enzyme Digestion Profile*) como el patrón de bandas de ADN característico de cada cepa obtenido con la utilización de una determinada enzima de restricción y tras la realización de la técnica de electroforesis con unos parámetros establecidos.

Esta técnica tiene como objetivo la obtención de patrones legibles de bandas que permitan la comparación de los distintos aislados y la determinación de su relación genética.

Esta técnica consta de los siguientes pasos:

- Extracción y purificación del ADN en condiciones que permitan resultados reproducibles.
- Digestión del ADN mediante endonucleasas que reconocen unas pocas secuencias diana.
- Electroforesis del producto de digestión en condiciones de cambio de la dirección del campo eléctrico.

La electroforesis normal es unidireccional e incapaz de separar entre sí fragmentos de más de 20 kb de tamaño, los cuales migran al unísono sin resolverse en bandas diferentes. Sin embargo PFGE es una electroforesis multidireccional con pulsos eléctricos de diferente duración, que permite (ya que el tiempo que requieren los fragmentos para reorientarse es proporcional a su tamaño) la separación de fragmentos de hasta 10 Mb.

3.4.2. Materiales

Los tampones (Tabla 10) utilizados para el desarrollo esta técnica fueron los siguientes:

Tabla 10. Relación de tampones utilizados en la electroforesis de campo pulsado

TAMPÓN	COMPOSICIÓN	CANTIDADES
EDTA 0,5M (pH 8)*	EDTA (Panreac)	186,1 g
	Agua Milli-Q	800 ml
	Agua destilada	Se enrasó hasta 1000 ml
Tris-ClH 1M (pH 8)*	Tris base (Panreac)	121,1 ml
	HCL 6N	80 ml
	Agua destilada	Se enrasó hasta 1000 ml
Buffer TE 1X (pH 8)**	Tris-HCL 1M	10 ml
	EDTA 0,5M	2 ml
	Agua Milli-Q	800 ml
	Agua destilada	Se enrasó hasta 1000 ml
Buffer CSB**	Tris-HCL 1M	10 ml
	EDTA 0,5M	20 ml
	Agua Milli-Q	40 ml
	Agua destilada	Se enrasó hasta 100 ml
Buffer Lisis (pH 8)**	Tris-HCL 1M	12,5 ml
	EDTA 0,5M	25
	N-L-Sark (Sigma) (10%)	25
	Agua Milli-Q	100
	Agua destilada	Se enrasó hasta 250 ml
Stock de Proteinasa K	Proteinasa K (Roche)	20 mg
	Agua Milli-Q estéril	1 ml
	Volumen total	1 ml
Tampón TBE 10x (pH 8,5)*	Tris	216 g
	Ácido Bórico (Panreac)	111,3 g
	EDTA	9,3 g
	Agua destilada	Se enrasó hasta 2000 ml

* Se esterilizó en autoclave y se conservó a 4°C.

** Se conservó a 4°C.

Los aparatos necesarios para la realización de esta técnica, fueron los siguientes:

- Baño termostático con agitación Memmert, referencia: WB/OB7- 45WBU45.
- Moldes desechables (Bio Rad).
- Agitador orbital Eppendorf, referencia: 3005GFL.
- Sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad) modelo 170-3690.
- Cubeta de electroforesis (Bio-Rad).
- Captador de imágenes Sistema Fluor-S (Bio-Rad) referencia: 170-7700-170- 7701.
- *Quantity- One*: programa informático para procesamiento de las imágenes.

3.4.3. Preparación de los bloques

1. Se prepararon dos baños termostáticos, uno a $56 \pm 1^\circ\text{C}$ y otro a $50 \pm 1^\circ\text{C}$.
2. Se procedió a pesar 0,25 g de agarosa al 1% (D-1 LOWEEO, Pronadisa), se añadieron 23,5 ml de buffer TE 1X y se agitó suavemente, a continuación se introdujo la mezcla en el microondas durante 30 segundos hasta su total disolución y se mantuvo en el baño termostático a $56 \pm 1^\circ\text{C}$ para evitar su solidificación.
3. Posteriormente, se añadieron a la agarosa 1,25 ml de SDS al 20% y se mantuvo esta mezcla en el baño termostático a una temperatura de $56 \pm 1^\circ\text{C}$ para su posterior utilización.
4. A partir de cultivos puros de 22 ± 2 horas de incubación en Ágar sangre, se tomaron 2-3 colonias con un hisopo estéril previamente humedecido en buffer CSB y se inocularon en un tubo, que contenía 2 ml de dicho buffer. Las bacterias se homogenizaron por agitación y posteriormente se procedió a ajustar la concentración bacteriana con un colorímetro (Vitek de bioMérieux) al 20% de transmitancia.
5. A continuación se tomaron 200 μl de la suspensión bacteriana y se añadieron a un tubo eppendorf vacío de 1,5 ml de volumen, previamente marcado con la referencia del aislado.

6. Tras este paso, se añadieron 10 μ l de proteinasa K a cada uno de los tubos eppendorf y se mezcló suavemente. Posteriormente se añadieron 200 μ l de la agarosa a cada uno de los tubos y se homogeneizó todo junto con la suspensión bacteriana.

7. Tras la homogenización, se dispensó esta mezcla en los moldes específicos para la realización de los bloques de PFGE (dos bloques por cepa), y se mantuvieron estos moldes a una temperatura de 4°C durante al menos 20 min para facilitar la solidificación de la agarosa.

3.4.4. Lisis bacteriana

Se dispensaron 5 ml del tampón de lisis en tubos universales, y se procedió a desmoldar los bloques en la solución. Se añadieron a cada tubo 25 μ l de Proteinasa K y se procedió a la incubación de los tubos durante 2 horas en un baño termostático a una temperatura de $56 \pm 1^\circ\text{C}$ en condiciones de agitación.

Durante este periodo de incubación, se procedió al precalentamiento del agua Milli-Q estéril y el buffer TE 1X en un baño termostático a una temperatura de $50 \pm 1^\circ\text{C}$.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de los bloques en el buffer de lisis, se retiró el tampón de lisis y se realizaron los lavados de los bloques: 2 lavados con agua MilliQ estéril y cuatro con Buffer TE 1X, todos ellos utilizando un volumen de 10 ml por aislado y durante un tiempo de 10 minutos a una temperatura de $50 \pm 1^\circ\text{C}$ en condiciones de agitación.

Una vez finalizados los lavados, los bloques se mantuvieron en tubos eppendorf con 1 ml de tampón TE 1X a una temperatura de 4°C hasta su utilización.

3.4.5. Restricción enzimática para *E. coli*

1. Preparación de la mezcla o *mix* para la realización de la predigestión

Se añadieron 200 μl de la mezcla o *mix* indicada en la siguiente tabla (Tabla 11) en un tubo eppendorf de 1,5 ml.

Con ayuda de un bisturí, se cortó una porción (aproximadamente un tercio) del molde de agarosa que contenía el ADN de la cepa en cuestión y se colocó en el tubo eppendorf que contenía la mezcla, de forma que el bloque quedara cubierto con la solución.

Tabla 11. Composición de la mezcla o *mix* para la predigestión enzimática

Componentes	Para 1 cepa	Para 10 cepas	Para 15 cepas
Agua Milli-Q estéril	180 μl	1800 μl	2700 μl
Buffer de la enzima (Tango)	20 μl	200 μl	300 μl
Volumen total	200 μl	2000 μl	3000 μl

Para la incubación, se introdujeron los tubos eppendorf en un baño termostático a una temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min, y, transcurrido este tiempo, se retiró el buffer dejando los bloques dentro de los mismos tubos para proceder a la realización de la digestión enzimática.

2. Preparación de la mezcla o *mix* para la realización de una digestión

Se añadiéron 200 μl de la mezcla o *mix*, indicada en la tabla 12, en cada tubo eppendorf y se incubaron en el baño termostático a una temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 horas.

Tabla 12. Composición de la mezcla o *mix* para la realización de la digestión enzimática

Componentes	Para 1 cepa	Para 10 cepas	Para 15 cepas
Agua Milli-Q estéril	175 µl	1750 µl	2625 µl
Buffer de la enzima (Tango)	20 µl	200 µl	300 µl
Enzima (<i>Xba</i> I)	5 µl	50 µl	75 µl
Volumen total	200 µl	2000 µl	3000 µl

Tras la incubación de los bloques, se procedió a la interrupción de la digestión. Para ello se retiró la solución de reacción y se añadieron 200 µl de tampón TBE 0,5X a cada uno de los tubos eppendorf.

La enzima de restricción que utilizamos en nuestro estudio fue *Xba*I (MBI Fermentas). Se eligió esta enzima por ser la enzima recomendada por diversos autores para la caracterización molecular mediante la técnica de PFGE para bacterias Gram negativas (Kariuki *et al.*, 1999b; Garaizar *et al.*, 2000; Liébana *et al.*, 2001; Iguchi *et al.*, 2002; Kawano *et al.*, 2006).

3.4.6. Separación de los fragmentos de ADN: condiciones para la electroforesis

En primer lugar, se prepararon 2,2 litros (l) de buffer TBE 0,5X. Antes de comenzar la electroforesis, se vertieron los 2,2 l de buffer TBE 0,5X en la cubeta para que recirculara y disminuyera la temperatura hasta los 14°C.

Se prepararon 200 ml de agarosa SKG al 1% en tampón TBE 0,5X (200 ml de buffer TBE 0,5X + 2 g de agarosa SKG), fundiéndose esta mezcla en el microondas hasta su disolución. La agarosa se mantuvo en baño termostático a $50 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta el momento de su empleo.

Una vez montado el soporte de forma adecuada, se colocó de forma horizontal el peine sobre él. Cada una de las porciones de los bloques se colocaron sobre uno de los extremos del peine, secándolos previamente en papel de filtro y dejando el primero de

los extremos del peine libre para colocar el marcador, que fué una cepa de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Braenderup (H9812).

Una vez colocados todos los bloques, se situó el peine de manera perpendicular al soporte y se vertió la mayor parte de la agarosa fundida. Una vez solidificada, se retiró el peine y se recubrieron los huecos con la agarosa restante.

Tras desmoldar el gel del soporte, se introdujo en la cubeta. Se colocó el gel en su posición y se seleccionaron los parámetros para la realización de la electroforesis. Los parámetros pulso inicial, pulso final y tiempo de electroforesis, se seleccionaron en función de la enzima utilizada (Tabla 13).

Tabla 13. Parámetros de electroforesis para la enzima *Xba*I

Enzima de restricción	Pulso inicial (s)	Pulso final (s)	Tiempo (h)	Angulo de inclinación	Voltaje
<i>Xba</i> I	2, 2	54, 2	19	120°	6 V/cm

La temperatura del tampón durante todo el tiempo de electroforesis, se mantuvo a 14°C.

Una vez finalizada la electroforesis se realizó la tinción del el gel por inmersión en una solución de Sybr-safe, preparado a una concentración de 60 µl/1000 ml (Invitrogen, ref: S33102), durante 20-30 min. Antes de la captura de la imagen, se visualizó el gel teñido en un transiluminador y en el caso de haber exceso de tinción, se retiró mediante la inmersión del gel en agua Milli-Q durante 20-30 min, dejándolo más tiempo si fuera necesario.

Para finalizar, se procedió a realizar la captura de la imagen del gel en un analizador de imágenes (Fluor-S Multimager, Bio-Rad, controlado por el programa informático *Quantity- One*).

3.4.7. Interpretación de los resultados de PFGE: análisis informático y estadístico

El análisis de los distintos pulsotipos o perfiles genéticos de llevó a cabo utilizando el programa informático *BioNumerics* versión 2.0 (*Applied Maths*). Este programa permitió comparar los patrones de bandas obtenidos en distintos geles e identificar los diferentes perfiles de restricción.

El establecimiento de la relación genética entre las cepas analizadas se realizó aplicando el coeficiente de similitud de Jaccard entre los distintos patrones de bandas obtenidos. A partir de los datos de la matriz de similitud obtenida se construyó un dendrograma mediante el método UPGMA (*Underweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages*).

Se consideró que dos o más aislados de *E. coli* eran la misma cepa cuando, independientemente del individuo de procedencia, presentaban un pulsotipo común.

3.5. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

La sensibilidad de los diferentes aislados de *E. coli* obtenidos a lo largo del presente estudio, fue determinada *in vitro* mediante el método de difusión en ágar. El material empleado para la realización de las pruebas fue el siguiente:

- Placas de medio sólido Ágar Mueller-Hinton comercial (bioMeriéux).
- Discos de papel de filtro impregnados en antibiótico (bioMeriéux).
- Tubos de agua destilada estéril con un volumen de 9,950 ml.
- Tubos de agua destilada estéril con un volumen de 4 ml.
- Densitómetro, sistema McFarland (bioMeriéux).

Las pruebas de difusión en ágar, se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo estándar del CLSI de 2006.

Se realizó una suspensión bacteriana en un tubo de agua destilada estéril con un volumen de 4 ml con una turbidez igual a 0,5 de McFarland y a continuación se transfirieron 50 µl de este inóculo a un tubo con 9,950 ml de agua destilada estéril.

Tras su homogeneización, se realizó una siembra por inundación en una placa de Ágar Mueller-Hinton durante 5-10 min y transcurrido este tiempo, se eliminó el exceso de sobrenadante. Las placas se secaron en una estufa de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 min y a continuación se colocó el disco del antimicrobiano elegido para la realización de la prueba y se volvió a incubar a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 22 ± 2 h. Se valoró el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y se comparó con las referencias oportunas publicadas por el CLSI.

Se realizó el estudio de la sensibilidad de todos los aislados clínicos de *E. coli* frente a un único agente antimicrobiano, la colistina. La elección de éste, se basó en el criterio de que es el único antibiótico permitido en avicultura comercial de puesta hasta el momento, que permite un periodo de supresión o retirada cero.

La interpretación de los resultados se realizó según las normas de la CLSI, clasificando a los aislados como resistentes (R), intermedios (I) o sensibles (S) en función del diámetro del halo de inhibición producido.

El antimicrobiano utilizado, concentración y sus valores de referencia se detallan en la Tabla 14.

Tabla 14. Características del antimicrobiano estudiado *in vitro* (CLSI, 2006)

Agente antimicrobiano	Concentración (µg colistina/disco)	Halo inhibición (mm)		
		R	I	S
Colistina	50	<15		≥15

3.6. ANÁLISIS INFORMÁTICO Y ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos del formulario, así como el registro de los animales y de los aislados que de ellos se obtuvieron, se almacenaron en una base de datos creada con el programa Microsoft® Access 2003.

La valoración epidemiológica llevada a cabo en las comparaciones realizadas entre los datos obtenidos se realizó mediante el Test exacto de Fisher, incluyendo la corrección de Yates, para un nivel de confianza del 95% (con este nivel de confianza, si el valor de p es inferior de 0,05 se considera que la diferencia es significativa). El cálculo y la interpretación de estos valores se realizó con la ayuda del programa informático de epidemiología Graphpad InStat 3.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

4.1.1. Aislamiento e identificación de *E. coli* a partir de muestras clínicas

Se han analizado un total de 238 muestras de órganos que presentaban lesiones compatibles con colibacilosis. Una vez llevado a cabo el protocolo de aislamiento descrito anteriormente (ver apartado 3.1.2.1.), se obtuvieron 173 aislados identificados como *E. coli* mediante pruebas bioquímicas (ver apartado 3.2.1.).

Tabla 15. Distribución de los aislados de *E. coli* según los órganos y lesiones procesadas

ÓRGANO	TIPO LESION	Muestras procesadas	Aislados obtenidos
Hígado	Perihepatitis	82	55
Peritoneo	Peritonitis	78	60
Pulmón	Aerosaculitis	32	24
Ovario-Oviducto	Ovaritis -Salpingitis	22	18
Pericardio	Pericarditis	20	12
Bazo	Congestión con esplenomegalia	2	2
Médula Ósea	Congestión	1	1
Riñón	Congestión renal	1	1
TOTAL		238	173

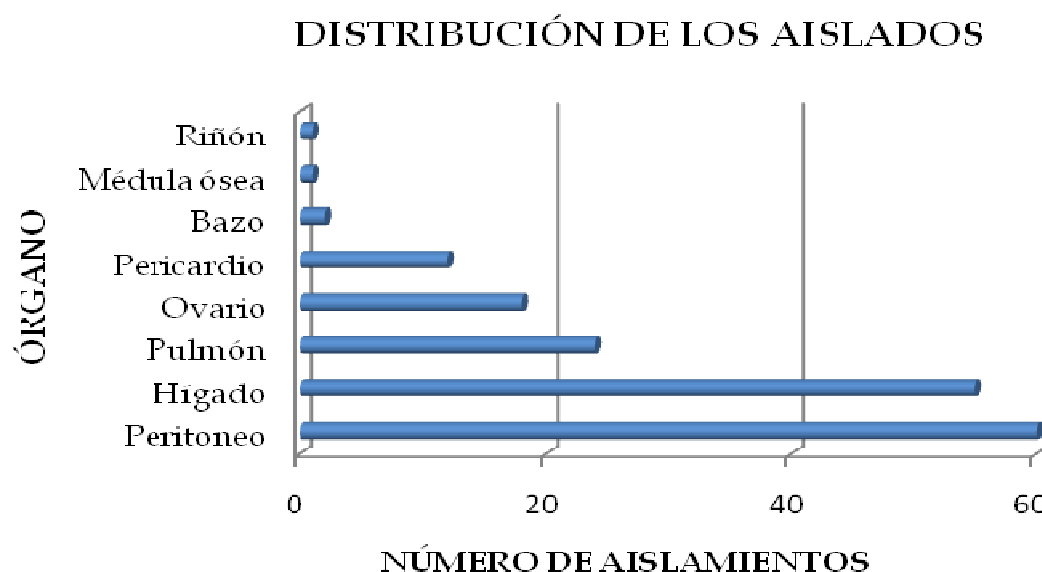
Tras el análisis microbiológico de las muestras, obtuvimos un 72,7% (173/238) de éxito en el aislamiento de *E. coli*, es decir, aproximadamente tres cuartas partes de las muestras tomadas con sospechas de colibacilosis, fueron positivas en el aislamiento e identificadas como *E. coli* (Tabla 15). El criterio para seleccionar los aislados integrantes del estudio se encuentran detallados en el apartado 3.1.2.3.

Nuestros resultados son muy similares a los obtenidos por Gomis *et al.*, (2001), quienes lograron un porcentaje de aislamiento de *E. coli* del 70,7%, a partir de animales

que presentaban lesiones compatibles con colibacilosis, como pericarditis, aerosaculitis y perihepatitis.

Gracias a la toma de muestras a partir de diferentes órganos, ha sido posible observar la distribución de los aislados de *E. coli* en función de éstos (Figura 14). Las muestras tomadas a partir de lesiones en peritoneo (peritonitis), es donde se ha obtenido un mayor porcentaje de aislamientos (60/173=34,8%), seguido de las muestras tomadas de hígado (55/173=31,9%), pulmón (24/173=13,8%), ovario (18/173=10,5%), pericardio (12/173=6,9%), bazo (2/173=1,1%) y por último, las muestras de médula ósea y de riñón con un 0,5% (1/173) respectivamente. Puede observarse como a pesar de haber contado con un mayor número de muestras de hígado, el porcentaje de aislamiento de *E. coli* ha sido menor.

Figura 14. Representación de la distribución de los aislados en función del órgano



Existen pocos estudios en los que se analicen los aislamientos de *E. coli* en función de los órganos procesados. En general, en la bibliografía se hace referencia a la colibacilosis como una enfermedad que cursa con septicemia, sin especificar a partir de qué órganos se toman las muestras. Se describen simplemente lesiones de pericarditis, lesiones septicémicas en bazo, perihepatitis, aerosaculitis, traqueitis, etc. (Nakamura *et al.*, 1985; Gomis *et al.*, 1997; Fisher *et al.*, 1998).

Figura 15. Lesiones de peritonitis en una gallina ponedora (cortesía M. Pizarro)

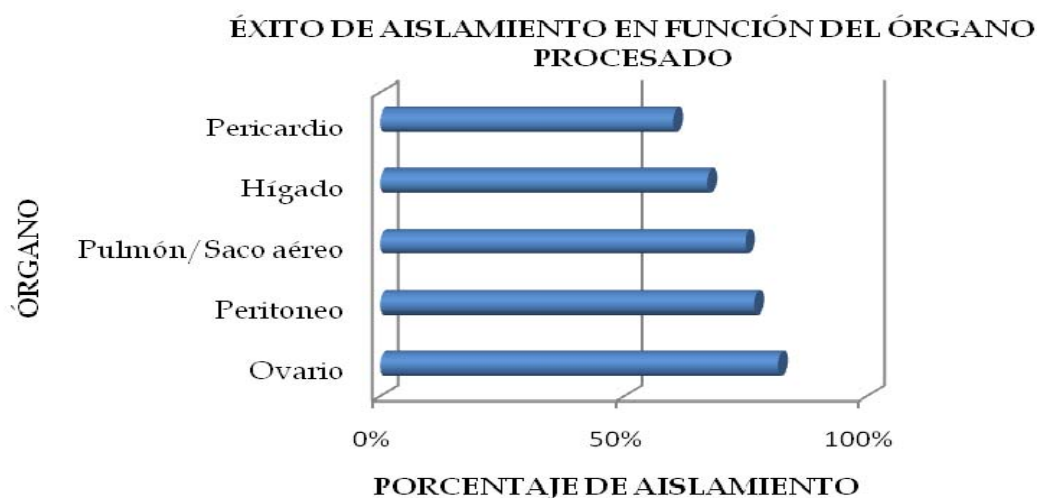


Los aislados de *E. coli* obtenidos a partir de lesiones de peritonitis (Figura 15) y perihepatitis suponen un 66,7% del total de los aislados. En la práctica, resulta interesante la observación de lesiones a nivel del ovario y oviducto, ya que la ovaritis y la salpingitis son lesiones muy indicativas de esta enfermedad.

Por nuestra experiencia, las lesiones en hígado (perihepatitis), peritoneo (peritonitis) y ovario/oviducto (ovaritis/salpingitis) son las que se observan mayoritariamente.

Si se analiza el éxito de aislamiento en función del órgano, relacionando el número de muestras tomadas de un órgano con el número de aislamientos obtenidos en el mismo (Figura 16), se observa como el mayor éxito se obtuvo tras procesar las muestras de ovario (ovaritis), con un 81,8% (18/22). A continuación, se situarían las muestras tomadas del peritoneo, con un 76,9% (60/78); las muestras tomadas de pulmón/sacos aéreos se situaron en tercer lugar con un 75% (24/31); a continuación las muestras de hígado, con un porcentaje del 67% (55/82) de aislamiento y por último, las muestras tomadas a partir de pericardio (pericarditis) en las que se obtuvo un éxito de del 60% (12/20).

Figura 16. Representación del éxito de aislamiento en función del órgano.



En las muestras de bazo, médula ósea y riñón se obtuvo un éxito de aislamiento del 100% (1/1), aunque estos resultados no son significativos ya que se partió de un escaso número de muestras.

Las diferencias encontradas entre los porcentajes de éxito de aislamiento entre los distintos órganos son consideradas, por el test de Fisher YATES, como estadísticamente no significativas ($p > 0,05$) para un nivel de confianza del 95%. Este hecho implica que las diferencias detectadas pueden deberse al azar, sin existir un órgano de preferencia en la toma de muestras. Por tanto, las posibilidades de aislamiento de *E. coli* son semejantes en todos los órganos que presenten lesiones compatibles con colibacilosis.

En coincidencia con nuestros resultados, los trabajos realizados por Bisgaard *et al.*, (1981); Jordan *et al.*, (2005) y Landman *et al.*, (2006), describen la importancia y frecuencia de los aislamientos a partir de lesiones de salpingitis, salpingoperitonitis y peritonitis.

4.1.2. Aislamiento e identificación de *E. coli* a partir de muestras fecales

Tras la realización de los protocolos de aislamiento microbiológico, descritos en el apartado 3.1.2.2, se obtuvieron 143 aislados de *E. coli*. La identificación a nivel de especie se realizó, en todos los casos, mediante pruebas bioquímicas (ver apartado 3.2.1.).

4.2. ANÁLISIS DE LA DETECCIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA: PATOTIPOS

Para la realización de la detección de los factores de virulencia se han incluido la totalidad de aislados de *E. coli* obtenidos, es decir, los 173 aislados clínicos y los 143 aislados de origen fecal.

4.2.1. Muestras de origen clínico

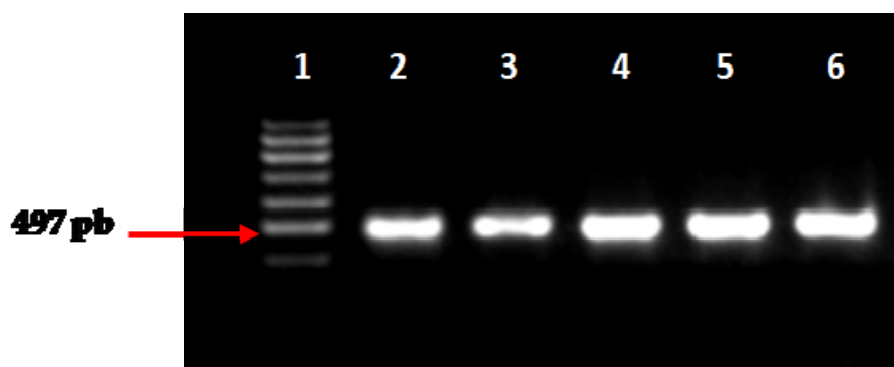
Tras la detección de los factores de virulencia seleccionados, se obtuvieron un total de 22 patotipos distintos (Tabla 16). Se define patotipo como la representación de una combinación de factores de virulencia detectados diferente (Delicato *et al.*, 2003).

Tabla 16. Representación de los patotipos obtenidos y el número de aislados clínicos de *E. coli* incluidos en cada uno de ellos

FACTORES DE VIRULENCIA						Patotipo n°	Número de aislados	Porcentaje
<i>fimC</i>	<i>fyuA</i>	<i>iss</i>	<i>iuC</i>	<i>tsh</i>	<i>cvi</i>			
+	+	+	+	+	+	1	51	29,5%
+	-	+	+	+	+	2	38	22,0%
+	+	+	+	+	-	12	13	7,5%
+	+	+	+	-	+	13	12	6,9%
+	-	-	-	-	+	7	11	6,4%
+	+	+	-	+	+	4	11	6,4%
+	-	+	-	-	+	5	6	3,5%
+	-	+	-	+	+	6	5	2,9%
+	-	+	+	-	-	3	5	2,9%
+	+	+	-	-	+	15	3	1,7%
+	-	-	-	-	-	10	3	1,7%
-	-	+	+	-	+	29	2	1,1%
+	+	+	+	-	-	30	2	1,1%
+	-	+	+	+	-	11	2	1,1%
+	-	-	+	+	+	8	2	1,1%
+	-	-	+	-	+	24	1	0,6%
+	-	+	-	+	-	28	1	0,6%
+	+	-	-	+	-	9	1	0,6%
+	-	-	-	+	+	18	1	0,6%
+	+	-	-	-	+	35	1	0,6%
+	+	-	-	+	+	22	1	0,6%
+	+	-	+	-	+	23	1	0,6%

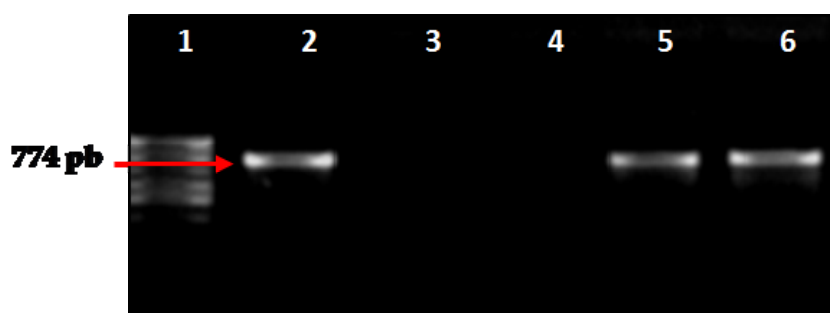
En la siguiente imagen (Figura 17), se pueden observar algunos de los resultados obtenidos mediante la PCR para la detección del factor de virulencia *fimC*:

Figura 17. Gel de PCR (*fimC*). Línea 1, marcador de peso (100 pb); línea 2, control positivo (cepa 2363); línea 3-6, cepas de *E. coli* aisladas en las que se detecta el factor *fimC*. El control negativo no aparece en la imagen



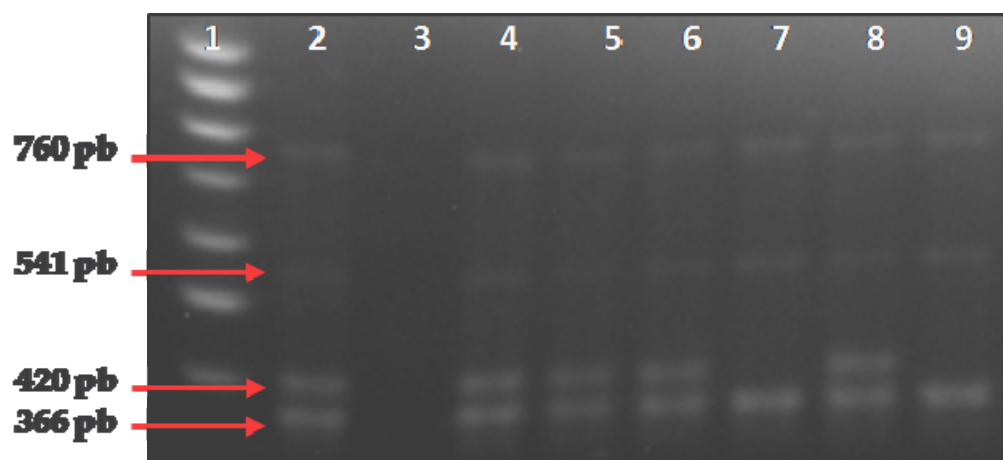
A continuación (Figura 18), una imagen de resultados obtenidos mediante la PCR para la determinación del factor de virulencia *fyuA*:

Figura 18. Gel de PCR (*fyuA*). Línea 1, marcador de peso (100 pb); línea 2, control positivo (cepa 2363); línea 3, control negativo; líneas 4-6, cepas de *E. coli* aisladas (las cepas 5 y 6 son positivas al factor *fyuA*)



En la Figura 19, se muestra un ejemplo de algunos resultados obtenidos mediante la PCR múltiple para la detección de los factores de virulencia *iss*, *iucC*, *tsh* y *cvi*:

Figura 19. Gel de PCR (múltiple). Línea 1, marcador de peso (100 pb); línea 2, control positivo (cepa 2363, cedida por la Dra. Nolan, L. K.); línea 3, control negativo; líneas 4-9, cepas de *E. coli* aisladas



4.2.1.1. Análisis de los factores de virulencia estudiados

Se aprecia un elevado porcentaje en la detección de los factores de virulencia estudiados. Todos ellos son relevantes, ya que aparecen en los aislados clínicos en una proporción superior al 50% (Tabla 17). Con estos resultados parece ser que el número de factores de virulencia detectados es frecuente e importante en la patogenicidad.

Tabla 17. Porcentaje de detección de cada factor de virulencia en aislados de origen clínico

Factor de Virulencia	Descripción	Número de Aislados	Porcentaje
<i>fimC</i>	Fimbria tipo 1	171/173	98,8%
<i>iss</i>	Supervivencia aumentada en suero	151/173	87,3%
<i>iucC</i>	Gen del operón aerobactina	129/173	74,6%
<i>tsh</i>	Hemaglutinina termosensible	126/173	72,8%
<i>cvi</i>	Gen de la inmunidad a la Colicina V	108/173	62,4%
<i>fyuA</i>	Receptor yersiniabactina	96/173	55,5%

1. Factor de virulencia *fimC*

El porcentaje de detección ha sido del 98,8%, por lo que su presencia se considera casi constante ya que se ha detectado prácticamente en la totalidad de los aislados clínicos. Nuestro resultado es muy similar a los obtenidos por Siek *et al.* (2005a; 2005b), 98%; Kawano *et al.* (2006), 96,7%; Ewers *et al.* (2004), 92%; McPeake *et al.* (2005), 90,4%. Sin embargo, Wooley *et al.* (1992); Knöbl *et al.* (2001) y Vandekerchove *et al.* (2005) obtuvieron un porcentaje de detección del 100%.

Según estos resultados, parece ser un factor indispensable en la virulencia de los aislados jugando un papel muy importante en la adhesión de *E. coli* a células epiteliales de aparato respiratorio, en concreto de la faringe y tráquea. Esta fase de adhesión representaría el primer paso en la infección (Suwanichkul y Panigrahy, 1986a; Gima y Panigrahy, 1988; Dozois *et al.*, 1990, 1994). El elevado porcentaje de aislados clínicos en los que se ha detectado la presencia de este factor, nos indicaría su importante repercusión en la virulencia.

2. Factor de virulencia *iss*

Es el segundo factor de virulencia más detectado, 87,3%. Nuestro resultado es similar a los obtenidos por Ewers *et al.*, (2004), Siek *et al.*, (2005a); (2005b), Jeffrey *et al.*, (2002) y Johnson *et al.*, (2006) en el que el porcentaje de detección en los dos primeros casos fue del 82% y en los otros dos casos, del 80%. En mayor proporción, Knöbl *et al.*, (2001), Ewers *et al.*, (2005) y Kawano *et al.*, (2006) detectaron este factor en el 100% de los aislados clínicos procesados.

Pfaff-McDonough *et al.*, (2000) y McPeake *et al.*, (2005), obtuvieron porcentajes de detección del 77% y 72,8% respectivamente, y en menor proporción, Vidotto *et al.*, (1990), que fue del 68,8%. En contraste, Delicato *et al.*, (2003) detectaron este factor de virulencia en menor porcentaje (38,5%), sin que aparentemente haya justificación para una diferencia tan notable.

El gen de la supervivencia aumentada en suero, *iss*, es de elevada importancia ya que permite a *E. coli* evadir las defensas del hospedador, multiplicarse y diseminarse

por todo el organismo, favoreciendo la colonización. Numerosos estudios, como los desarrollados por Pfaff-McDonough *et al.*, (2000) y Horne *et al.*, (2000), han detectado este factor en una proporción significativamente mayor en aislados clínicos que en aislados procedentes de animales sanos. Con sus resultados sugieren que la presencia de este gen podría actuar como un indicador de virulencia. Johnson *et al.*, (2002), coincide con lo anteriormente expuesto señalando que la resistencia aumentada en suero podría ser indicativo de la habilidad de estos aislados de causar enfermedad.

3. Factor de virulencia *iucC*

El porcentaje de detección del factor *iucC* ha sido del 74,6%, resultado muy similar a los obtenidos por Vidotto *et al.*, (1990), Knöbl *et al.*, (2001), Jeffrey *et al.*, (2002), Ewers *et al.*, (2004) y Siek *et al.*, (2005b), en la que los valores de detección de este factor de virulencia oscila entre el 66,6% y 86%.

Wooley *et al.*, (1992) y Allan *et al.*, (1993) detectaron este factor en el 95% de los aislados, resultado muy similar a los obtenidos por Ngeleka *et al.*, (2002), 92,3%; McPeake *et al.*, (2005), 97,4% y Kawano *et al.*, (2006), 93,3%. Un poco más elevado ha sido el resultado del trabajo de Ewers *et al.*, (2005) en el que obtuvieron un porcentaje del 100%.

Estudios realizados por Linggood *et al.*, (1987) y Dozois *et al.*, (1992) hacen referencia al elevado porcentaje de detección de este factor y a su correlación con la virulencia. Lafon *et al.*, (1987), obtuvieron un porcentaje de detección del 100% en los aislados altamente virulentos, del 97% en los aislados moderadamente virulentos, del 58% en los aislados de baja virulencia y del 8% en los aislados no virulentos (no letales en pollitos de 1 día de edad).

El hierro es uno de los factores limitantes del crecimiento de las bacterias en los tejidos corporales. Por este motivo, el factor de virulencia *iucC* es de elevada importancia ya que su función como sistema de captación y liberación del hierro favorece la supervivencia de los aislados clínicos en el hospedador.

4. Factor de virulencia *tsh*

Se ha detectado la presencia del factor *tsh* en el 72,8% de los aislados. En la bibliografía consultada existe bastante variabilidad en cuanto a los valores de detección de este factor de virulencia, nuestro estudio se situaría entre los porcentajes medio-elevados.

Resultados similares han sido obtenidos por Siek *et al.*, (2005b) y Johnson *et al.*, (2006), donde el porcentaje de detección fue del 63,2% y 62,2% respectivamente.

Valores superiores a nuestro resultado, fueron logrados por Janben *et al.*, (2001), con un porcentaje de detección del 85,3%, Ngeleka *et al.*, (2002) y McPeake *et al.*, (2005), donde obtuvieron valores del 90,4% y 93,9% respectivamente.

Dozois *et al.*, (2000) y Maurer *et al.*, (1998), detectaron este factor de virulencia en el 49,7% y 46% de los aislados estudiados. Ewers *et al.*, (2004) y Kawano *et al.*, (2006), también lo determinaron en menor proporción que en nuestro estudio, en el 53,3% de los casos, al igual que Ewers *et al.*, (2005), obtuvo un porcentaje del 50% y Delicato *et al.*, (2003), del 39,5%.

5. Factor de virulencia *cvi*

El factor *cvi* es el responsable de la inmunidad a la colicina V (ColV). En nuestro estudio detectamos este factor en el 62,4% de los aislados, un resultado muy similar al obtenido por Siek *et al.*, (2005b), que fue del 66,8%, Wooley *et al.*, (1992), del 65%, Ewers *et al.*, (2004), del 62,7%, Vidotto *et al.*, (1990), del 57,7%.

Sin embargo, McPeake *et al.*, (2005) y Jeffrey *et al.*, (2002) consiguieron detectar este factor en mayor proporción, 99,1% y 86% respectivamente. A pesar de que ColV es uno de los tipos de colicina característicos en APEC, da Silveira *et al.* (2002) sugieren con sus estudios, la implicación de otras en la virulencia de *E. coli*.

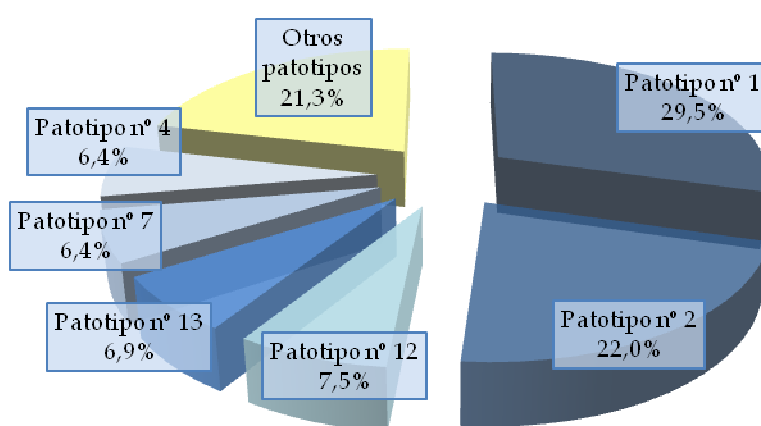
6. Factor de virulencia *fyuA*

El factor *fyuA*, implicado en sistemas de captación de hierro, ha sido detectado en nuestro estudio en un porcentaje del 55,5%. Este resultado es prácticamente similar a los obtenidos por Siek *et al.*, (2005b), que fue del 58,6% y Kawano *et al.*, (2006), del 53,3%. Janben *et al.*, (2001), tras procesar 150 aislados de *E. coli* obtuvo una proporción algo mayor, un 66% de cepas *fyuA* positivas.

4.2.1.2. Cuantificación de la detección de factores de virulencia

A pesar del elevado número de patotipos obtenido, destaca la presencia de un grupo mayoritario formado por seis de ellos (Figura 20). El punto de corte para establecer este grupo ha sido incluir todos aquellos patotipos que representen, al menos, al 5% de los aislados clínicos estudiados. Éste criterio englobaría un total de 136 aislados, es decir al 78% de los aislados estudiados.

Figura 20. Representación del grupo mayoritario por patotipos en aislados clínicos



La característica más importante de este grupo, es la de estar integrado por patotipos en los que se detecta un elevado número de factores de virulencia. En concreto, en el patotipo uno (29,5%) se detectan todos los factores estudiados, en el patotipo dos (22%) todos los factores excepto *fyuA*, en el patotipo doce (7,5%) todos excepto *cvi*, en el

patotipo trece (6,9%) todos excepto *tsh* y en el patotipo cuatro (6,3%) todos excepto *iucC*. La única excepción es el patotipo siete (6,3%), en el que sólo se detectan dos factores de virulencia, *fimC* y *cvi*.

Al comparar los porcentajes obtenidos de cada uno de los patotipos dentro del grupo mayoritario, existe una notable diferencia. Dos de los seis patotipos representan conjuntamente al 51,5% del total de los aislados, son el patotipo uno (en el que se detectan todos los factores de virulencia) y el dos (sólo falta el factor *fyuA*). Su característica común es estar integrados por un elevado porcentaje de factores de virulencia.

Por tanto, se puede apreciar como el número de factores de virulencia y su implicación en cuadros clínicos de colibacilosis es importante y frecuente (Skyberg *et al.*, 2003; Ewers *et al.*, 2005). El mayor porcentaje lo hemos obtenido en aquellos patotipos en los que se han detectado cinco y seis de los factores estudiados (Tabla 18) con un 42,8% y 29,5% respectivamente.

Tabla 18. Distribución de los aislados clínicos de *E. coli* según el número de factores detectados

Número de factores de virulencia detectados	Número de aislados	% del total de aislados
6	51/173	29,5%
5	74/173	42,8%
4	16/173	9,2%
3	18/173	10,4%
2	11/173	6,3%
1	3/173	1,7%
0	0/173	-

Aunque el patotipo nº 7 no haya sido de los más relevantes en los aislados clínicos en cuanto al número de factores detectados, posteriormente comprobaremos su implicación en los aislados de origen fecal, siendo el más prevalente ya que se determinó en el 33,5% de los casos.

El hecho de que encontremos el mismo patotipo en muestras clínicas y fecales, podría explicarse con algunas de las posibles vías de transmisión de la colibacilosis,

mencionadas entre otros por Landam *et al.*, (2006) que describe en su trabajo las siguientes vías de infección:

- A partir de partículas contaminantes (de origen fecal) en suspensión que infectarían el aparato respiratorio de las aves y a partir de este punto se diseminan por el organismo, produciendo una infección general o septicemia. Esta vía de infección sería la más aceptada en la colibacilosis aviar.
- También se han descrito otras rutas de infección como la diseminación de *E. coli* desde el lumen intestinal y por contaminación fecal ascendente a través de la cloaca y traspaso hacia el oviducto.

Es muy importante destacar que la mayor parte de los factores de virulencia se encuentran localizados en elementos genéticos transferibles, plásmidos y trasposones. Debido a este hecho, los patotipos considerados *a priori* como los más comunes implicados en casos clínicos de colibacilosis, podrían verse desplazados por otros menos frecuentes, ya que el número de genes de virulencia y sus posibles combinaciones son muy elevadas (Khac *et al.*, 2006).

Aunque todos los factores de virulencia son importantes en el desarrollo de la colibacilosis, parece que no existe un factor concreto que sea indispensable para la patogenicidad. El número de factores implicados y las posibilidades de combinación entre éstos es lo que aumentaría la virulencia (Tivendale *et al.*, 2004).

4.2.1.3. Correlaciones entre los factores de virulencia detectados

Según los resultados obtenidos, se puede comprobar la existencia de un elevado número de combinaciones entre los factores de virulencia estudiados. Al igual que en nuestro caso, McPeake *et al.*, (2005) y Kawano *et al.*, (2006) hacen referencia a este hecho.

Por este motivo, únicamente se han valorado (teniendo en cuenta la totalidad de aislados clínicos) las combinaciones de factores incluídas en el grupo mayoritario establecido (ver apartado 4.2.1.2.), por ser las más frecuentemente representadas. La combinación *fimC+* *iss* también se analizó en esta valoración por su alta implicación.

Tabla 19. Distribución de los aislados clínicos de *E. coli* según las combinaciones de factores obtenidas

Nº de factores detectados	Combinación de factores	Nº de aislados	% (del total)
6	<i>fimC</i> + <i>fyuA</i> + <i>iss</i> + <i>iucC</i> + <i>tsh</i> + <i>cvi</i>	51	29,5%
5	<i>fimC</i> + <i>iss</i> + <i>iucC</i> + <i>tsh</i> + <i>cvi</i>	89 (38 + 51)	51,5%
	<i>fimC</i> + <i>fyuA</i> + <i>iss</i> + <i>iucC</i> + <i>tsh</i>	64 (13 + 51)	37%
	<i>fimC</i> + <i>fyuA</i> + <i>iss</i> + <i>iucC</i> + <i>cvi</i>	63 (12 + 51)	36,4%
	<i>fimC</i> + <i>fyuA</i> + <i>iss</i> + <i>tsh</i> + <i>cvi</i>	62 (11 + 51)	35,8%
	<i>fimC</i> + <i>cvi</i>	144	83,2%
2	<i>fimC</i> + <i>iss</i>	149	86,1%

Los porcentajes de cada una de las combinaciones de factores se ha calculado teniendo en cuenta la totalidad de aislados.

Como se puede observar en la tabla anterior (Tabla 19), la combinación más frecuente es aquella en la que se detectan los factores *fimC* + *iss* + *iucC* + *tsh* + *cvi*. Esta asociación se presenta en más de la mitad de los aislados estudiados (51,5%). De un modo significativo se han obtenido otras combinaciones integradas por un elevado número de factores de virulencia.

La combinación más frecuente de dos factores es la asociación *fimC* + *iss*, ha sido determinada en el 86,1% de los aislados. Este porcentaje es similar al obtenido por Ewers *et al.*, (2004) y McPeake *et al.*, (2005), que fue del 78,7%, sugiriendo un papel altamente importante de estos dos factores en la patogénesis de la colibacilosis.

También resulta interesante la combinación de los factores *fimC* + *cvi*, integrantes del patotipo siete (que forma parte del grupo mayoritario). Ha sido detectada en la gran mayoría de los aislados clínicos, en el 83,2%. Ewers *et al.*, (2004), obtuvieron un porcentaje inferior de esta combinación del 60,7%.

El 79,3% de los aislados estudiados por Janben *et al.*, (2001), presentaron la combinación de los factores *fimC* + *iucC* + *tsh*. En nuestro caso, este porcentaje fue del 61,3%.

Si realizamos una comparación entre nuestros resultados y los obtenidos por Ewers *et al.*, (2004) vemos como, en general, nuestros porcentajes en cuanto a la asociación de

los factores *tsh/iucC* (61,3%), *iucC/iss* (72,2%) e *iucC/cvi* (61,9%), son muy similares a los obtenidos en su estudio, siendo éstos del 52,7%, 70,7% y 62,7% respectivamente. Estos porcentajes son inferiores en el trabajo desarrollado por Delicato *et al.*, (2003), en el que obtuvieron los siguientes resultados: 38,5%, 31,0% y 35,0% respectivamente.

En resumen, vemos que existe una gran variedad y número de factores de virulencia implicados en la colibacilosis y por tanto, las posibilidades de combinaciones entre éstos incrementan la variabilidad y diversidad de *E. coli*.

En concordancia con nuestros resultados encontramos los obtenidos por Mokady *et al.*, (2005) donde sugieren que cada uno de los pasos de los que consta la infección por *E. coli*, podría deberse a un número elevado y variable de factores de virulencia, indicando la existencia de un sistema combinado de ellos y la necesidad de una múltiple expresión para alcanzar la patogenicidad.

Tivendale *et al.*, (2004) resalta la importancia de las combinaciones de factores, siendo éstas las responsables del incremento de la virulencia.

4.2.2. Muestras de origen fecal

Tras la determinación de los factores de virulencia seleccionados, se obtuvieron un total de 25 patotipos distintos, lo que indica una vez más la gran variabilidad existente en los aislados de *E. coli*. Cada uno de los patotipos, representa una combinación de factores de virulencia detectados diferente (Delicato *et al.*, 2003). En la siguiente tabla (Tabla 20) se muestran los patotipos obtenidos, así como el número de aislados fecales incluido en cada uno de ellos.

Tabla 20. Representación de los patotipos obtenidos y el número de aislados fecales de *E. coli* incluidos en cada uno de ellos

FACTORES DE VIRULENCIA						PATOTIPO	N° aislados	Porcentaje
<i>fimC</i>	<i>fyuA</i>	<i>iss</i>	<i>iucC</i>	<i>tsh</i>	<i>cvi</i>			
+	-	-	-	-	+	7	48	33,6%
+	-	+	-	-	+	5	18	12,5%
+	-	+	+	-	+	19	10	7,0%
+	+	+	+	+	+	1	9	6,3%
+	-	-	+	-	+	24	6	4,2%
-	-	+	-	-	+	27	6	4,2%
-	-	-	-	-	+	25	6	4,2%
+	-	-	-	-	-	10	5	3,5%
-	-	-	+	-	+	26	4	2,8%
+	-	+	+	+	+	2	4	2,8%
+	+	-	-	+	+	22	4	2,8%
-	-	+	+	-	+	29	4	2,8%
+	-	-	-	+	+	18	3	2,1%
+	+	+	+	-	+	13	2	1,4%
+	-	+	-	+	-	28	2	1,4%
+	+	+	-	+	-	21	2	1,4%
+	+	-	+	-	+	23	2	1,4%
+	+	-	-	-	+	35	1	0,7%
-	+	-	+	-	+	34	1	0,7%
-	-	+	-	+	-	33	1	0,7%
+	+	-	-	-	-	32	1	0,7%
+	+	-	+	+	+	36	1	0,7%
+	-	-	-	+	-	14	1	0,7%
-	-	-	-	+	+	37	1	0,7%
-	-	-	-	-	-	38	1	0,7%

4.2.2.1. Análisis de los factores de virulencia estudiados

En general, se aprecia un porcentaje de detección factores de virulencia inferior al obtenido en los aislados de origen clínico (Tabla 21), a excepción de los factores *cvi* y

fimC que se detectaron en gran proporción, 90,9% y 83,2% respectivamente. Este último factor, *cvi*, incluso superó al obtenido en los aislados clínicos.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos de cada uno de los factores independientes:

Tabla 21. Porcentaje de detección de cada factor de virulencia en aislados de origen fecal

Factor de Virulencia	Descripción	Número de aislados	Porcentaje
<i>cvi</i>	Gen de la inmunidad a la Colicina V	130/143	90,9%
<i>fimC</i>	Fimbria tipo 1	119/143	83,2%
<i>iss</i>	Supervivencia aumentada en suero	58/143	40,5%
<i>iucC</i>	Gen del operón aerobactina	43/143	30,0%
<i>tsh</i>	Hemaglutinina termosensible	28/143	19,5%
<i>fyuA</i>	Receptor yersiniabacina	22/143	15,4%

1. Factor de virulencia *fimC*

El porcentaje de detección del factor *fimC* ha sido del 83,2%, resultado coincidente con Vandekerchove *et al.*, (2005) que detectaron este factor en un 84% de los aislados. Valores superiores fueron obtenidos por Delicato *et al.*, (2003) y Kawako *et al.*, 2006, fueron del 92% y del 93,3% respectivamente. El valor más elevado en cuanto a la detección de este factor ha sido del 99,0%, obtenido por Siek *et al.*, (2005).

Resultados inferiores a nuestro porcentaje, han sido logrados por Wooley *et al.*, (1992), obtuvo un 57,5% y McPeake *et al.*, (2005) y Johnson *et al.*, (2006), del 26,7% y 26,1% respectivamente.

2. Factor de virulencia *iss*

Hemos obtenido un porcentaje de detección del 40,5%. Nuestro resultado es muy parecido a los obtenidos por: Vandekerchove *et al.*, (2005), donde el porcentaje fue del 48% y, algo inferior por Ewers *et al.*, (2005), del 33,3%.

El porcentaje más elevado dentro de la bibliografía consultada ha sido el obtenido por Kawano *et al.*, (2006) fue del 63,3%. En contraste, valores claramente inferiores han sido logrados por Siek *et al.*, (2005), quienes detectaron este factor en el 18,3% de los aislados y McPeake *et al.*, (2005) y Delicato *et al.*, (2003) donde los porcentajes fueron del 17,8% y del 16% respectivamente.

3. Factor de virulencia *iucC*

El porcentaje de detección en nuestro estudio ha sido del 30,0%, resultado muy similar a los obtenidos por Ewers *et al.*, (2005), donde el porcentaje de detección fue del 33,3% y Vandekerchove *et al.*, (2005), del 32%. En contraste, McPeake *et al.*, (2005), obtuvo un porcentaje muy superior al nuestro, 95,6%, igual que Siek *et al.*, (2005), Wooley *et al.*, (1992), Ngeleka *et al.*, (2002) y Kawano *et al.*, (2006), quienes obtuvieron porcentajes del 74,0%, 75%, 63,5% y 50% respectivamente. En el trabajo llevado a cabo por Delicato *et al.*, (2003), sólo consiguieron un porcentaje de detección del 12%.

4. Factor de virulencia *tsh*

El factor de virulencia *tsh* se ha detectado en el 19,5% de los aislados. Este factor se detecta en general en baja proporción, Delicato *et al.*, (2003), Ewers *et al.*, (2005) y Maurer *et al.*, (1998), obtuvieron porcentajes de detección del 4%, 0% y 0% respectivamente. Ngeleka *et al.*, (2002), Vandekerchove *et al.*, (2005), Siek *et al.*, (2005), Johnson *et al.*, (2006) y Kawano *et al.*, (2006), obtuvieron valores superiores, 51,9%, 40%, 41,3%, 40,7% y 33,3%. El mayor porcentaje fue obtenido por McPeake *et al.*, (2005) y fue del 93,3%, este resultado difiere con todos los estudios anteriores.

5. Factor de virulencia *cvi*

En nuestro estudio obtuvimos un porcentaje de detección del 90,9%, porcentaje muy similar al obtenido por McPeake *et al.*, (2005), que fue del 82,2%. Los valores de detección de este factor son muy elevados, tanto en los aislados fecales como en los clínicos.

En otros estudios, este porcentaje ha sido inferior, Wooley *et al.*, (1992), obtuvo un 47,5%, Vandekerchove *et al.*, (2005), un 36%, Kawano *et al.*, (2006), un 13,3%, Delicato *et al.*, (2003), un 10% y Siek *et al.*, (2005), Blanco *et al.*, (1997) y Ewers *et al.*, (2005), obtuvieron los porcentajes más bajos, 9,6%, 7% y 0% respectivamente.

6. Factor de virulencia *fyuA*

Hemos obtenido un porcentaje de detección del 15,4%. Nuestro resultado es inferior a los obtenidos por Vandekerchove *et al.*, (2005), Siek *et al.*, (2005) y Kawano *et al.*, (2006) que fueron del 44%, 32,7% y 26,6% respectivamente.

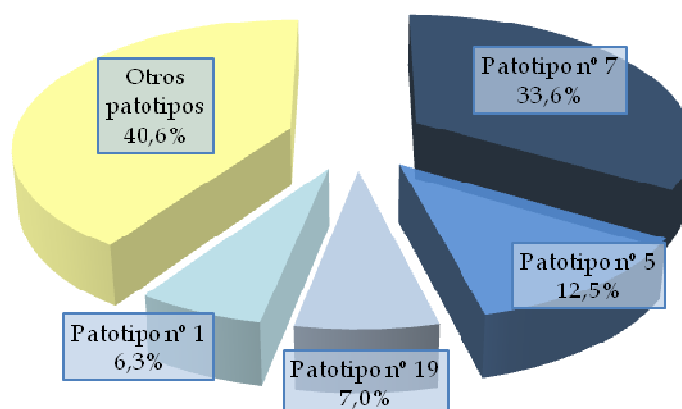
Según estos resultados, y en coincidencia con numerosos autores (Pfaff-McDonough *et al.*, 2000, Delicato *et al.*, 2003, Vandekerchove *et al.*, 2005, McPeake *et al.*, 2005, Wooley *et al.*, 1992 y Johnson *et al.*, 2006), se extrae la idea de que en los aislados fecales la detección de los factores de virulencia es inferior y no es tan constante como en el caso de los aislados clínicos. Existen notables diferencias en cuanto a los porcentajes de detección obtenidos en los diferentes estudios consultados, pudiendo encontrar valores muy elevados en unos casos e incluso ausencia de detección en otros.

4.2.2.2. Cuantificación de la detección de factores de virulencia

A pesar del elevado número de patotipos obtenido, igual que en el caso de los aislados clínicos, destaca la presencia de un grupo mayoritario formado por cuatro de ellos (Figura 21). El punto de corte para establecer este grupo ha sido seleccionar todos aquellos patotipos que representen al menos al 5% de los aislados estudiados. Éste

criterio englobaría un total de 85 aislados fecales, es decir, al 60% de los aislados estudiados.

Figura 21. Representación del grupo mayoritario por patotipos en aislados fecales



Dentro del grupo mayoritario, existen importantes diferencias en cuanto a la distribución de los patotipos. Solamente uno de los patotipos, el nº 7 (en el que se detectan *fimC* y *cvi*), supera tanto en número de aislados como en porcentaje a la suma de los otros tres patotipos integrantes del grupo (1, 5 y 19).

Si comparamos este grupo con el establecido en el caso de los aislados clínicos, se pueden apreciar patotipos que representan un menor número de factores de virulencia, a excepción del patotipo nº 1 donde se detectan todos. Por tanto, el número de factores de virulencia más frecuente en los aislados fecales (Tabla 22), han sido aquellos en los que se han detectado dos (43,3%) y tres (24,5%) de los factores estudiados.

Tabla 22. Distribución de los aislados fecales de *E. coli* según el número de factores detectados.

Número de factores detectados	Número de aislados	Porcentaje
6	9/143	6,3%
5	7/143	4,9%
4	18/143	12,6%
3	35/143	24,5%
2	62/143	43,3%
1	11/143	7,7%
0	1/143	0,7%

La idea principal que podemos obtener con estos resultados, es que el número de factores de virulencia detectados en los aislados fecales es bajo (Skyberg *et al.*, 2003; Ewers *et al.*, 2005). Es importante destacar la presencia del patotipo n° 7, que forma parte también del grupo mayoritario clínico, y la contribución del patotipo n° 1. Aunque éste no sea muy representativo en los aislados fecales, se ha determinado en el 6,3% de los casos e integra todos los factores de virulencia estudiados.

Es muy importante recordar una vez más, que la mayor parte de los factores de virulencia pueden transferirse de unas cepas a otras (Khac *et al.*, 2006). Por este motivo, los patotipos considerados *a priori* como los más comunes implicados en casos clínicos de colibacilosis, podrían verse desplazados por otros menos frecuentes y viceversa.

4.2.2.3. Correlaciones entre los factores de virulencia detectados

Según los resultados obtenidos, se puede apreciar la existencia de un elevado número de combinaciones entre los factores de virulencia. De este modo, para estudiar dichas correlaciones, sólo valoramos (teniendo en cuenta la totalidad de aislados) las representadas en el grupo mayoritario establecido (ver apartado 4.2.2.2).

Tabla 23. Distribución de los aislados fecales de *E. coli* según las combinaciones de factores obtenidas

Nº de factores detectados	Combinación de factores	Nº de aislados	% (del total)
4	<i>fimC</i> + <i>iss</i> + <i>iucC</i> + <i>cvi</i>	25	17,5 %
3	<i>fimC</i> + <i>iss</i> + <i>cvi</i>	43	30%
2	<i>fimC</i> + <i>cvi</i>	108	75,5%

Según este análisis (Tabla 23), la combinación de los factores *fimC* + *cvi* es la más frecuente entre los aislados fecales, detectándose en el 75,5% de los aislados estudiados. Esta combinación es, así mismo, la más frecuentes en los aislados clínicos.

La detección de esta correlación en tan alto porcentaje en los aislados fecales podría significar la existencia de un probable reservorio de cepas con unas características “potencialmente” patógenas.

A diferencia de los resultados obtenidos en los aislados clínicos, en la bibliografía consultada no ha sido fácil encontrar estudios de combinaciones de factores en aislados fecales.

Sin embargo, sí se han realizado numerosos estudios comparativos de las frecuencias de detección de factores entre ambos, observando porcentajes superiores en los aislados patógenos (Wooley *et al.*, 1992; Pfaff-McDonough *et al.*, 2000; Delicato *et al.*, 2003; McPeake *et al.*, 2005; Vandekerchove *et al.*, 2005 y Johnson *et al.*, 2006).

4.2.3. Comparación entre la detección de factores de virulencia en aislados clínicos y fecales

Según nuestros resultados, el factor de virulencia *fimC* ha sido el único detectado en un elevado porcentaje en los dos tipos de muestras, siendo del 98,8% en las muestras clínicas y del 83,2% en los aislados de origen fecal. La diferencia entre ambos valores se considera estadísticamente significativa. Podría tratarse de un factor indispensable para el desarrollo de la acción patógena de *E. coli*, manifestando así la importancia de la

capacidad de adhesión que deben poseer las cepas aviares de *E. coli* para iniciar el proceso de infección a nivel respiratorio (La Ragione *et al.*, 2000).

Para establecer la comparación estadística entre los factores de virulencia según su origen, se ha planteado la hipótesis inicial de que la probabilidad de su detección es superior en los aislados clínicos que en los de origen fecal (Tabla 24). En todos los casos se cumple esta hipótesis a excepción del factor *cvi*, en el que la probabilidad de detectarlo es significativamente superior en los aislados fecales que en los clínicos. Este hecho podría ser debido a que la producción colicinas es más necesaria a nivel intestinal que a nivel sistémico, por una cuestión de competencia entre cepas de *E. coli*.

Tabla 24. Comparación estadística entre los porcentajes de detección de cada factor de virulencia dependiendo de su origen (fecal o clínico)

Factor de Virulencia	Porcentaje aislados clínicos	Porcentaje aislados fecales	Valor p
<i>cvi</i>	62,4%	90,9%	P<0,0001
<i>fimC</i>	98,8%	83,2%	P<0,0001
<i>iss</i>	87,3%	40,5%	P<0,0001
<i>iucC</i>	74,6%	30,0%	P<0,0001
<i>tsh</i>	72,8%	19,5%	P<0,0001
<i>fyuA</i>	55,5%	15,4%	P<0,0001

Al igual que en el caso anterior, los factores *fyuA*, *iss*, *iucC* y *tsh* han sido detectados en mayor proporción en los aislados clínicos que en los de origen fecal, aunque las diferencias entre ambos grupos son mucho mayores. Así, el factor *fyuA* se ha detectado en un 55,5% en los aislados clínicos y en un 15,4% en los fecales; *iss* en un 87,3% y 40,5%; *iucC* en el 74,6% y 30,0% y *tsh* en el 72,8% y 19,5%.

En coincidencia con nuestros resultados, encontramos los estudios realizados por Wooley *et al.*, (1992), Pfaff-McDonough *et al.*, (2000), Delicato *et al.*, (2003), McPeake *et al.*, (2005), Vandekerckhove *et al.*, (2005) y Johnson *et al.*, (2006), en los que se confirma la idea de una mayor detección de factores de virulencia en los aislados clínicos.

Así, al igual que en nuestro estudio, defienden la participación conjunta de un elevado número de factores de virulencia en el desarrollo de la colibacilosis. Según los datos obtenidos, este hecho podría ser una característica diferencial entre ambos tipos de aislados, en la que un mayor número de factores de virulencia podría implicar una mayor actividad patogénica.

Es muy importante destacar la idea transmitida por Vandekerchove *et al.*, (2005) por la que se sugiere que ningún factor de virulencia estudiado ni sus posibles combinaciones son exclusivas de los aislados clínicos responsables de los brotes de colibacilosis. Señala la posibilidad de que factores medioambientales así como otros factores de virulencia no incluidos en su estudio, pudieran desencadenar la aparición de un brote.

El hecho de no detectar ninguno de los factores de virulencia estudiados no implica ausencia de patogenicidad, ya que los aislados podrían presentar otros factores no incluidos en este estudio (Delicato *et al.*, 2003).

4.3. DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO SOMÁTICO: SEROGRUPOS

Unicamente se realizó la determinación del antígeno somático en los aislados clínicos. Debido a la gran diversidad de resultados obtenidos, se decidió no ampliar este estudio con los aislados fecales.

Los resultados obtenidos han sido los siguientes (Tabla 25): se ha determinado el serogrupo en 116 aislados, es decir, en el 67% de los casos. También se ha obtenido un 14,45% (25/173) de aislados “no tipables” (NT) y un 18,49% (32/173) de aislamientos denominados “no determinados” (ND), en los que no se pudo determinar el antígeno somático con la batería de sueros seleccionada en nuestro estudio. En coincidencia con nuestros resultados, autores como Blanco *et al.*, 1994 y Parveen *et al.*, 2001, obtuvieron porcentajes del 19% y 22% en el número de aislados en los que no se pudo determinar el serogrupo (ND).

Los 116 aislados tipados se han distribuido en un total de doce serogrupos diferentes y de entre todos ellos, hemos establecido la presencia de un grupo mayoritario

formado por cinco (O78, O88, O1, O20 y O2) que representa el 57,8% del total de los aislados clínicos incluidos en el estudio y el 86,2% de los aislados tipables. El criterio para establecer este grupo ha sido considerar aquellos serogrupos que representaban al menos al 5% del total de aislados.

Tabla 25. Distribución de los aislados clínicos de *E. coli* según los serogrupos obtenidos

Serogrupo	Número de aislados	Porcentaje (del total de aislados)	Porcentaje (de los tipados)
O78	38	22%	32,8%
O88	26	15%	22,4%
O1	16	9,2%	13,8%
O20	11	6,3%	9,5%
O2	9	5,2%	7,7%
O8	4	2,3%	3,4%
O36	3	1,7%	2,6%
O103	3	1,7%	2,6%
O9	2	1,1%	1,7%
O17	2	1,1%	1,7%
O11	1	0,6%	0,9%
O115	1	0,6%	0,9%
NT	25	14,4%	-
ND	32	18,5%	-
TOTAL	173		

Según los datos obtenidos, el número de serogrupos implicados en los cuadros clínicos de colibacilosis aviar, es relativamente elevado. Nuestros resultados coinciden con multitud de autores (Gross, 1958; Sojka y Carnaghan, 1961; Cheville y Arp, 1978; Caugant *et al.*, 1985; Cloud *et al.*, 1985; Achtman y Pluschke, 1986; Whittam y Wilson, 1988; Glunder, 1990; Vidotto *et al.*, 1990; White *et al.*, 1990; Dozois *et al.*, 1992; Allan *et al.*, 1993; Messier *et al.*, 1993; Peighambari *et al.*, 1995; Blanco *et al.*, 1998; Dho-Moulin *et al.*, 1999; Gomis *et al.*, 2001; Janben *et al.*, 2001; da Silveira *et al.*, 2002; Jeffrey *et al.*, 2002; La Ragione *et al.*, 2002; Barnes *et al.*, 2003; Delicato *et al.*, 2003; Ewers *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003; Ewews *et al.*, 2004; Rosario *et al.*, 2004; Ewews *et al.*, 2005; McPeake *et al.*, 2005; Mokady *et al.*, 2005; Siek *et al.*, 2005a, 2005b; Vandekerchove *et al.*, 2005; Kawano *et al.*,

2006) que afirman que aunque ciertos serogrupos (O1, O2 y O78) hayan sido considerados como los más frecuentemente implicados en colibacilosis aviar, realmente el número de éstos es muy elevado.

En coincidencia con nuestros datos, otros autores (Jeffrey *et al.*, 2002) señalan la presencia de un grupo mayoritario, formado también por cinco serogrupos distintos (O2, O5, O8, O15 y O78) que representa al 58% de los aislados estudiados. El porcentaje del serogrupo O78 es similar en ambos estudios, 18% frente al 22% y en el caso del serogrupo O2 la diferencia es mayor, 27% frente a nuestro 5,2%. De cualquier modo, dos de los tres serogrupos considerados como los más prevalentes en aislados patogénicos se encuentran presentes en dichos estudios.

Si analizamos únicamente los serogrupos considerados como los más frecuentes (O1, O2 y O78), vemos que en nuestro estudio suponen el 36,4% del total de los aislados y el 54,3% de los tipados, es decir, representan una proporción importante aunque no mayoritaria.

Sojka y Carnaghan, (1961), establecieron un porcentaje de aislados pertenecientes a estos serogrupos bastante variable, entre el 15-61%. Dentro de este intervalo, y en coincidencia con ellos, encontramos a Allan *et al.*, (1993) obtuvo un porcentaje del 23%, Ngeleka *et al.*, (2002), del 25%, Gomis *et al.*, (2001), del 26,2% y Ewers *et al.*, (2004), consiguió el valor más elevado, 49,6%.

Del total de aislados, el serogrupo más representado es O78 con un porcentaje del 22%. Este resultado es similar al 18% determinado por Jeffrey *et al.*, (2002), e inferior al 52% obtenido por Dozois *et al.*, (1992), siendo éste el serogrupo más prevalente en su estudio.

En segundo lugar hemos detectado el serogrupo O88, que engloba al 15% de los aislados. Autores como Dho-Moulin *et al.*, (1999) y Gomis *et al.*, (2001) consideran este serogrupo como uno de los más frecuentes entre los aislados clínicos aviares.

A continuación encontramos los serogrupos O1 detectado en el 9,2% de los aislados (16/173), O20 en el 6,3% (11/173) y O2 en el 5,2% (9/173). En contraste con lo habitualmente considerado, los serogrupos O1 y O2 no han sido los más frecuentes entre los aislados clínicos.

Si comparamos nuestros resultados con la bibliografía existente, observamos una elevada variabilidad de resultados en cuanto a los porcentajes obtenidos. Lo que se

mantiene constante es la idea de que aquellos serogrupos considerados como los más frecuentes, se han visto desplazados en mayor o menor grado por otros. Así, Siek *et al.*, (2005a), afirman que sólo el 5% de los aislados serotipables analizados pertenecían a los serogrupos O78 y O2, el resto se encontraba distribuido en numerosos serogrupos. Resultados similares fueron obtenidos por McPeake *et al.*, (2005), donde el 45,6% de los aislados pertenecían al serogrupo O78 y el 15% al O2. Vandekerchove *et al.*, (2005), el 60% de los aislados procesados pertenecían al serogrupo O78 y el 12,5% al O2. Cloud *et al.*, (1985), identificaron 37 serogrupos diferentes, O2 fue el más representativo con el 29% de los aislados, y O78 el 12%. Barnes *et al.*, (2003), el 15% de los aislados pertenecía a los serogrupos O1, O2, O35, O36 y O78.

Whittam y Wilson, (1988), detectaron 15 serogrupos diferentes a partir de 74 aislados clínicos, distribuyéndose principalmente en los serogrupos O2 (59%), O35 (5%) y O78 (5%). Dozois *et al.*, (1992), determinaron 16 serogrupos a partir de 112 aislados, los más prevalentes fueron O78 (52%) y O1 (6%).

Rosario *et al.*, (2004), obtuvieron un 85% de aislados tipables distribuidos en los serogrupos O19 (12%), O84 (9%), O8 (6%) y O78 (5%). Los resultados del estudio realizado por Knöbl *et al.*, (2001) en avestruces, fueron los siguientes: el 50% de los aislados pertenecía al serogrupo O2, el 25% al O78, el 12,5% al O9 y el 12,5% al O21.

Monroy *et al.*, (2005), obtuvieron un 20% de aislados pertenecientes al serogrupo O2, el 16,6% al O78, el 13,3% al O5, el 6,6% al O53 y el 3,3% al O1, O36 y O45.

4.3.1. Correlación entre el serogrupo y los factores de virulencia detectados en los aislados clínicos

Se ha realizado un estudio comparativo entre los patotipos y serogrupos en búsqueda de una posible relación entre ambas caracterizaciones, cuyos resultados se expresan a continuación (Tabla 26):

Tabla 26. Correlación entre serogrupos y patotipos en los aislados clínicos de *E. coli*

Serogrupo	N° aislados	Patotipo	N° aislados	FACTORES DE VIRULENCIA					
				<i>fimC</i>	<i>fyuA</i>	<i>iss</i>	<i>iucC</i>	<i>tsh</i>	<i>cvi</i>
O78	38	1	28 (73, 6%)	+	+	+	+	+	+
		2	5	+	-	+	+	+	+
		13	4	+	+	+	+	-	+
		15	1	+	+	+	-	-	+
O88	26	2	23 (88, 4%)	+	-	+	+	+	+
		5	1	+	-	+	-	-	+
		6	2	+	-	+	-	+	+
O1	16	1	1	+	+	+	+	+	+
		4	7	+	+	+	-	+	+
		12	1	+	+	+	+	+	-
		13	4	+	+	+	+	-	+
		35	1	+	+	-	-	-	+
		5	1	+	-	+	-	-	+
		6	1	+	-	+	-	+	+
O20	11	1	11 (100%)	+	+	+	+	+	+
O2	9	1	8 (88, 8%)	+	+	+	+	+	+
		23	1	+	+	-	+	-	+
O8	4	7	2	+	-	-	-	-	+
		15	1	+	+	+	-	-	+
		24	1	+	-	-	+	-	+
O36	3	2	1	+	-	+	+	+	+
		7	1	+	-	-	-	-	+
		10	1	+	-	-	-	-	-
O103	3	2	2	+	-	+	+	+	+
		8	1	+	-	-	+	+	+
O9	2	5	1	+	-	+	-	-	+
		7	1	+	-	-	-	-	+
O17	2	5	2	+	-	+	-	-	+
O11	1	10	1	+	-	-	-	-	-
O115	1	11	1	+	-	+	+	+	-

Para valorar los resultados no se han tenido en cuenta los aislados NT ni los ND. Debido a la elevada diversidad de serogrupos obtenidos, sólo se han analizado aquellos considerados en el punto anterior como mayoritarios (O78, O88, O1, O20 y O2).

En el caso de los serogrupos O78, O20 y O2 hay un claro predominio del patotipo nº 1. Se puede observar, como a pesar de que el serogrupo O78 esté integrado por cuatro patotipos diferentes, es el patotipo 1 el que representa una mayor proporción de aislados, el 73,6%. En el serogrupo O20, todos los aislados pertenecen a este mismo patotipo y en el caso del serotipo O2, el 88,8% de los aislados, también se engloban en este patotipo nº 1.

En el serogrupo O88, el 88,4% de los aislados pertenecen al patotipo nº 2, y la única excepción donde no predomina ningún patotipo es el serogrupo O1, formado por siete patotipos diferentes.

En consecuencia, los serogrupos O78, O88, O20 y O2 se caracterizan por estar integrados, en su gran mayoría, por aislados en los que se han determinado todos los factores de virulencia estudiados (patotipo nº 1) o todos excepto el factor *fyuA* (patotipo nº 2).

Según los resultados obtenidos, se podría vincular sólo en cierto modo, un serogrupo con un patotipo determinado. Sólo con analizar el serogrupo de un aislado clínico, podríamos estimar el patotipo más probable. Si obtuviéramos un aislado del serogrupo O20, lo relacionaríamos casi con seguridad con el patotipo nº 1; si fuera O78, el aislado tendría un 73,6% de probabilidad de pertenecer a este mismo patotipo y si fuera del O2, la probabilidad sería del 88,8%. Lo mismo ocurriría con el serogrupo O88, en el 88,4% de los casos cabría esperar que el aislado perteneciera al patotipo nº 2. En coincidencia con nuestros resultados, Khac *et al.*, (2006) confirman las elevadas posibilidades de asociación entre serogrupos y patotipos.

Ewers *et al.*, (2004), obtuvieron seis patotipos diferentes entre los aislados del serogrupo O1, trece en los aislados del serogrupo O2 y nueve en los del serogrupo O78. En los aislados donde no se determinó el serogrupo, el 50%, obtuvieron 34 patotipos diferentes. Mokady *et al.*, (2005), observaron diferencias en cuanto a la detección de factores de virulencia entre las cepas pertenecientes a cada uno de los serogrupos O2 y O78, a pesar de poder provocar cuadros clínicos muy similares. Resultados similares

fueron demostrados Knöbl *et al.*, (2001). Por tanto, se evidencia la dificultad de correlación entre ambos parámetros.

Con todos estos resultados, es difícil vincular un serogrupo determinado a una mayor virulencia, por lo que esta técnica no debería ser considerada como la única herramienta diagnóstica para la caracterización de APEC (Coimbra *et al.*, 2000). Al igual que en nuestro caso, Ewers *et al.*, (2004; 2005) sugieren en sus estudios la aplicación otras técnicas complementarias en el diagnóstico; Tamaki, *et al.*, (2005), indican también las limitaciones de ésta técnica para la identificación de *E. coli* causantes de diarrea ya que sólo sería útil en un escaso número de serogrupos.

Se han realizado varias experiencias para la prevención de la colibacilosis mediante vacunas en las que se han incluido los serogrupos O1, O2, O35 y/o O78 (Deb y Harry, 1978; Rosenberg *et al.*, 1985; Melamed *et al.*, 1991; Kwaga *et al.*, 1994). Según nuestros resultados, y en vista del elevado número de serogrupos detectados, sólo podríamos apoyar la idea de la gran dificultad a la hora de elaborar este tipo de vacunas.

Gyimah *et al.*, (1986), Dho-Moulin, (1993) y Blanco *et al.*, (1998) sugieren en sus estudios una mayor efectividad de autovacunas elaboradas con diversos tipos de factores de adhesión o adhesinas. Esto podría impedir los primeros estadíos de la enfermedad, gracias a la adhesión de *E. coli* al epitelio respiratorio de las aves.

De todo lo anteriormente descrito, se puede concluir que parece existir una cierta correlación entre los serogrupos y patotipos determinados, pero en ningún caso lineal, solo presuntiva, por lo que la caracterización de cepas clínicas debería incluir otras técnicas complementarias para ser más adecuada y completa.

4.4. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO (PFGE): PULSOTIPOS

4.4.1. Estudio mediante *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) de los aislados clínicos

Para que un método de caracterización sea considerado válido debe ser capaz de tipar al menos el 90% de las cepas bacterianas (Maslow *et al.*, 1993). Se ha analizado la totalidad de aislados clínicos de *E. coli*, obteniendo un 90,75% de los aislamientos tipables, lo cual demuestra la validez de esta técnica para su utilización en estudios de caracterización de cepas de *E. coli* aviares. También confirma los datos de Kawano *et al.*, (2006) quienes obtuvieron un porcentaje de cepas tipables del 100%.

Además, este método mostró un poder discriminatorio superior al de otras técnicas, como las fenotípicas, permitiendo diferenciar entre aislados que mostraron un mismo perfil bioquímico, hecho ya observado por otros autores en otros grupos bacterianos (Privitera *et al.*, 1998; Nazarowec y Farber, 1999; Vela *et al.*, 2000).

Tras la realización del estudio mediante la técnica de PFGE, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 27):

Tabla 27. Resultados obtenidos mediante PFGE en aislados clínicos

<i>E. coli</i> estudiados	<i>E. coli</i> tipados	PERFILES DE RESTRICCIÓN		
		UNICO	MÚLTIPLE	Total perfiles
173	157/173 (90,75%)	44/72 (61,1%)	28/72 (38,8%)	72

Los 157 aislados se englobaron en un total de 72 patrones de restricción diferentes. Se obtuvieron 44 perfiles únicos (incluían un único aislamiento cada uno) por mostrar patrones de bandas altamente diferenciados y los 28 perfiles restantes fueron perfiles de restricción múltiple, ya que los patrones de bandas resultaron indistinguibles e incluían más de un aislamiento, en concreto, 113 de los 157 aislados tipables. También se obtuvieron 16 cepas autolíticas (9,2%) consideradas como no tipables (NT). Estos aislados poseen enzimas *DNA-asa* que digieren el ADN en el proceso de formación de

los bloques o durante su almacenamiento, por tanto, no se obtiene ningún patrón de bandas.

El hecho de que más de la mitad de los pulsotipos, 44 de los 72 obtenidos (61,1%) incluyera un único aislamiento es de nuevo, al igual que las pruebas genotípicas, un buen indicativo de la elevada heterogenicidad existente en los aislados clínicos de *E. coli* estudiados.

Con la finalidad de establecer posibles relaciones genéticas entre los aislados clínicos de *E. coli*, se elaboró un dendrograma simple a partir de los resultados obtenidos en los diferentes geles de PFGE (Figura 22). En el siguiente dendrograma (Figura 23) se indican todos los perfiles de restricción obtenidos, así como el número de aislamientos incluido en cada uno de ellos. Este dendrograma se ha realizado aplicando el método UPGMA.

Figura 22. Gel de PFGE: representación de los distintos patrones de bandas en los aislados clínicos; Líneas 1,10, 18 y 27 patrón de peso molecular, líneas 2-9, 11-17, 19-26 cepas de *E. coli* aisladas.

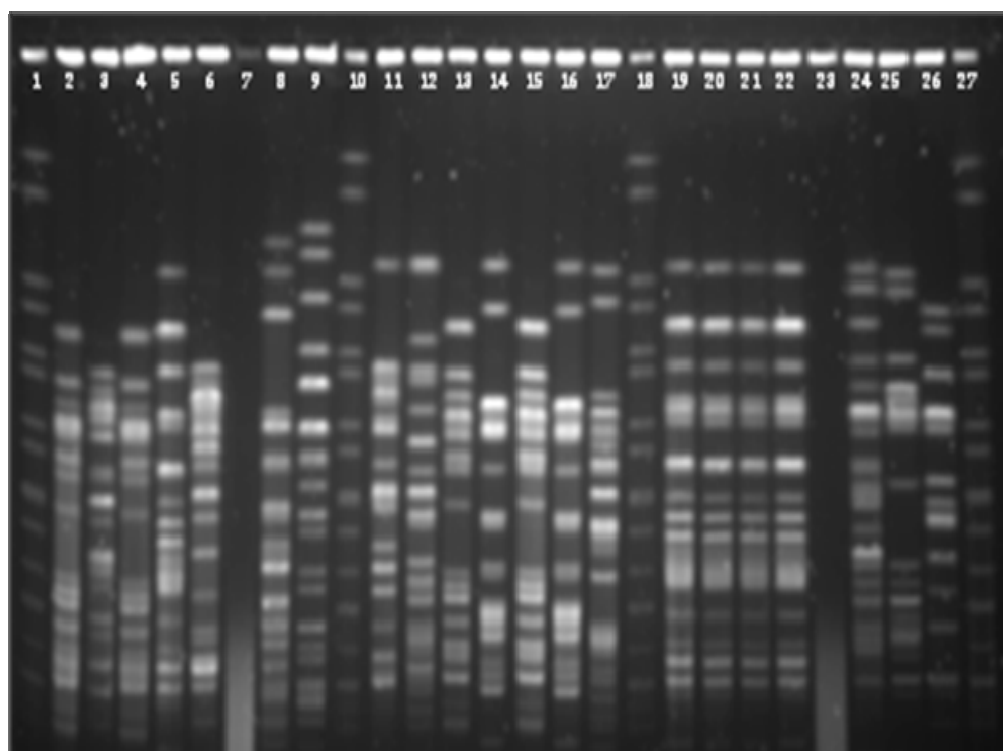
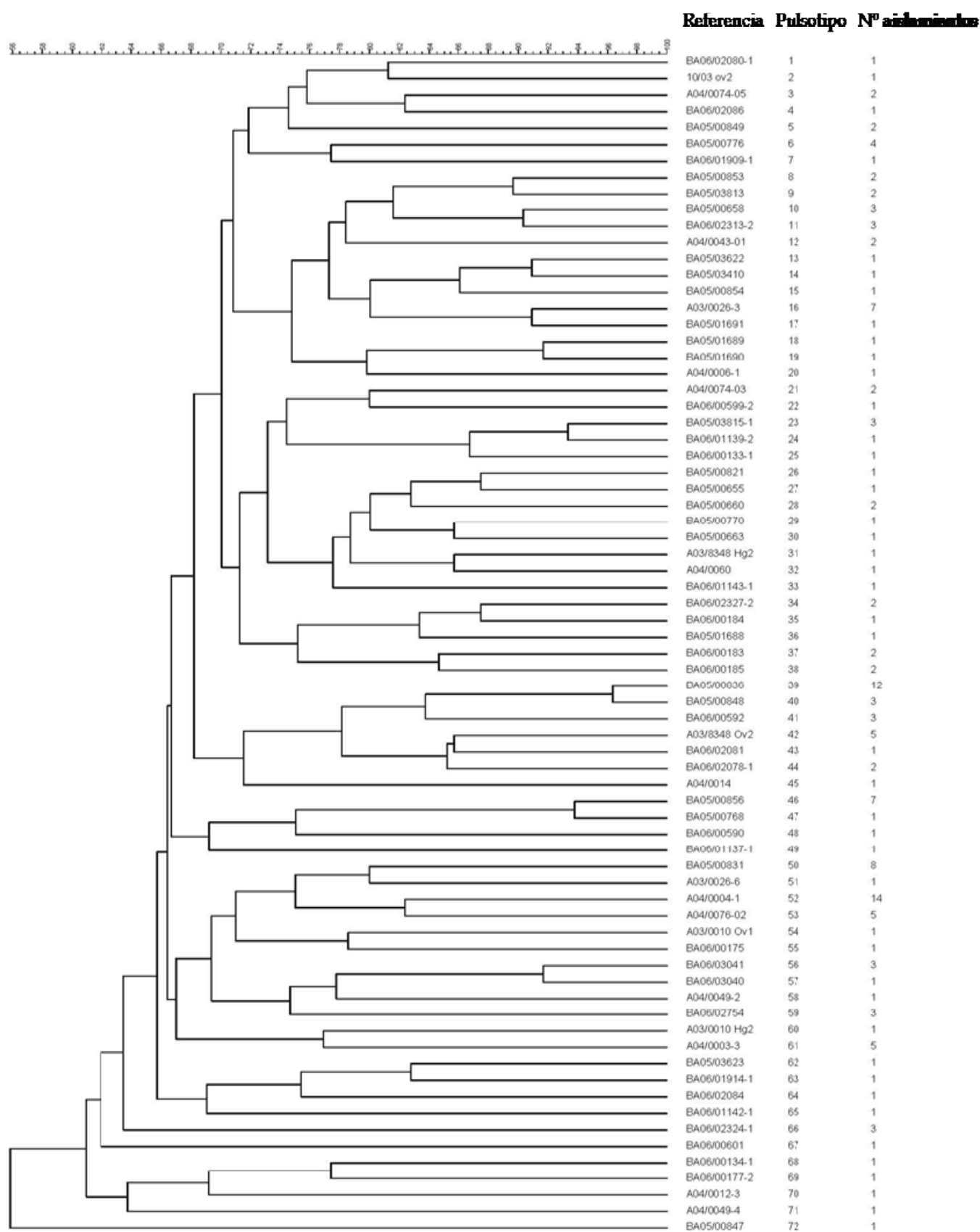


Figura 23. Representación de los perfiles de restricción obtenidos en aislados clínicos por PFGE.



El resultado más concluyente que podemos extraer de este dendrograma (Figura 23) es que en general, existe un elevado número de perfiles de restricción. De este modo, es muy difícil establecer relaciones claras entre los aislamientos clínicos obtenidos. Se puede observar que incluso los aislados implicados en un determinado brote de colibacilosis, pertenecen en general a varios pulsotipos, lo que significa que un brote puede no estar producido únicamente por una cepa de *E.coli*, sino por la acción conjunta de distintas cepas (ver apartado 4.4.3.) Por tanto, nuestros resultados parecen no sustentar la idea inicial de que los brotes de colibacilosis aviar se desarrollan por la intervención de una única cepa.

En coincidencia con nuestros resultados, encontramos los estudios desarrollados por Kawano *et al.*, (2006), que obtuvieron 21 perfiles de restricción diferentes a partir de 30 aislados clínicos, de los cuales 15 (71,4%) eran perfiles de restricción únicos y 6 (28,5%) fueron perfiles múltiples. Khac *et al.*, (2006) realizaron un estudio mediante PFGE entre 46 aislados clínicos de *E. coli* en cerdos, obteniendo 36 perfiles de restricción diferentes (78,26%). Este hecho, confirma una vez la elevada diversidad genética entre la población de *E. coli* implicada en casos clínicos de colibacilosis.

Moulin *et al.*, (2006), compararon 22 aislados clínicos de origen humano con 16 de origen aviar del mismo serotipo, obteniendo 37 perfiles de restricción diferentes. Parveen *et al.*, (2001) también demostró una elevada diversidad genética en los aislados de *E. coli* estudiados, al igual que Iguchi *et al.*, (2002) que obtuvo perfiles de restricción diferentes en todos los aislados de ECEH estudiados.

Con nuestros resultados y en coincidencia con la bibliografía consultada, parece confirmarse la gran diversidad y heterogeneidad de cepas implicadas en los casos clínicos de colibacilosis.

4.4.1.1. Asociación entre los perfiles de restricción obtenidos con el serogrupo y el patotipo

○ **ASOCIACIÓN PULSOTIPO-SEROGRUPO:** la siguiente tabla (Tabla 28), representa los pulsotipos obtenidos en función de los serogrupos determinados y entre paréntesis se muestra el número de aislados incluido en cada pulsotipo.

Tabla 28. Distribución de los aislados clínicos en función de los pulsotipos y serogrupos obtenidos

Serogrupos	Número de aislamientos	Pulsotipos diferentes	Distribución de los aislados por pulsotipo
O1	16	7	34 (2), 12 (2), 16 (7), 11 (1), 51 (1), 18 (1), 19 (1), NT (1)
O20	11	7	23 (3), 37 (2), 11 (2), 24 (1), 25 (1), 62 (1), 29 (1)
O78	38	9	59 (3), 56 (3), 61 (5), 50 (8), 42 (5), 53 (3), 68 (1), 58 (1), 57 (1), NT (8)
O88	26	9	28 (2), 40 (3), 39 (12), 41 (3), 44 (2), 8 (1), 43 (1), 30 (1), 32 (1)
O2	9	7	3 (2), 9 (2), 13 (1), 14 (1), 15 (1), 69 (1), 70 (1)
ND	32	21	66 (3), 5 (2), 21 (2), 10 (3), 8 (1), 53 (1), 46 (5), 2 (1), 48 (1), 22 (1), 7 (1), 4 (1), 63 (1), 1 (1), 47 (1), 27 (1), 45 (1), 67 (1), 20 (1), 64 (1), 71 (1), NT (1)
NT	32	7	52 (14), 53 (1), 6 (3), 72 (1), 33 (1), 35 (1), 65 (1), NT (3)
O17	2	1	46 (2)
O8	4	4	38 (1), 60 (1), 49 (1), 36 (1)
O11	1	1	38 (1)
O103	3	1	6 (1), NT(2)
O9	2	2	54 (1), 55 (1)
O36	3	2	31 (1), 26 (1), NT (1)
O115	1	1	17 (1)
TOTAL	173		

Según nuestros datos y en el mejor de los casos, un serogrupo se correspondería con un pulsotipo concreto con menos del 50% de probabilidad. En el caso del serogrupo O1, un 43,75% de los aislados (7/16) pertenecería a un único pulsotipo, el n° **16**. Lo mismo ocurriría con el serogrupo O88, donde el 46,15% de los aislados (12/26) se englobarían en el pulsotipo n° **39**.

Es importante destacar que cuando un mismo pulsotipo engloba diferentes serogrupos, puede ser debido a que la enzima utilizada presente un bajo poder discriminatorio, por ejemplo, el pulsotipo n° **11** se ha determinado en los serogrupos O1 y O20. Por tanto, para poder aumentar la capacidad de discriminación se debería haber incluido una segunda enzima de restricción.

Nuestros resultados coinciden en general con los obtenidos por otros autores. Ewers *et al.*, (2004), que a pesar de haber incluido solamente en el estudio los serogrupos O1, O2 y O78, no encontraron una relación muy evidente entre estas dos técnicas. Kawano *et al.*, (2006) obtuvieron una gran diversidad en cuanto a perfiles de restricción, concluyendo que no existe una clara relación entre esta técnica y el serogrupo. Al igual que en nuestro estudio, Caugant *et al.*, (1985) y Khac *et al.*, (2006) obtuvieron una elevada variabilidad en cuanto al número de perfiles de restricción y a la distribución de los serogrupos. Rivas *et al.*, (2006) determinaron una amplia variabilidad genética en las cepas de *E. coli* O157 involucradas en cuadros de SUH, ya que obtuvieron 40 perfiles de restricción diferentes a partir de los 66 aislados estudiados. Mora *et al.*, (2006) estudiaron las posibles relaciones genéticas entre aislados de *E. coli* O157:H7, obteniendo 14 perfiles de restricción diferentes. Tutenel *et al.*, (2003), obtuvieron perfiles de restricción diferentes en el 29% de los aislados de *E. coli* del serogrupo O157.

Por tanto, y en coincidencia con la bibliografía consultada, nuestra conclusión más relevante en la asociación pulsotipo-serogrupo es que no podemos establecer un nexo evidente entre ambos parámetros. Según los datos estudiados, esto hecho se debe fundamentalmente al elevado número de perfiles de restricción obtenidos, así como a la diversidad de pulsotipos incluidos en cada uno de los serogrupos determinados.

○ **ASOCIACIÓN PULSOTIPO-PATOTIPO:** para la valoración de las posibles asociaciones, sólo se han tenido en cuenta los patotipos del grupo mayoritario (1, 2, 4, 7, 12 y 13). En la Tabla 29, se representan los pulsotipos obtenidos en función de los patotipos determinados. Entre paréntesis se muestra el número de aislados pertenecientes a cada pulsotipo.

Tabla 29. Distribución de los aislados clínicos en función de los pulsotipos y patotipos obtenidos

Patotipos	Número de aislamientos	Pulsotipos diferentes	Distribución de los aislados por pulsotipo
1	51	20	11 (2), 13 (1), 14 (1), 15 (1), 24 (1), 23 (3), 25 (1), 42 (5), 62 (1), 50 (8), 69 (1), 53 (2), 3 (1), 61 (4), 29 (1), 37 (2), 9 (2), 18 (1), 70 (1), 68 (1), NT (11)
2	35	16	31 (1), 32 (1), 44 (2), 6 (2), 8 (2), 43 (1), 63 (1), 40 (3), 39 (12), 41 (3), 1 (1), 61 (1), 56 (3), 57 (1), 72 (1), 4 (1), NT (2)
12	13	2	19 (1), 52 (12)
13	12	6	11 (1), 34 (1), 12 (2), 53 (2), 66 (3), 59 (3)
4	11	4	10 (3), 16 (6), 20 (1), 51 (1)
7	11	10	22 (1), 7 (1), 36 (1), 55 (1), 5 (1), 49 (1), 45 (1), 67 (1), 64 (1), 71 (1), NT (1)
TOTAL	133		

Al igual que en el caso anterior, los resultados muestran una gran variación de perfiles de restricción dentro de cada uno de los patotipos seleccionados. Existe una excepción de difícil justificación en el patotipo n° **12**, donde el 92,3% de los aislados pertenece al pulsotipo n° **52**.

Nuestros datos coinciden con Ewers *et al.*, (2004), que defienden la distribución aleatoria de genes de virulencia entre los distintos perfiles de restricción ya que no pudieron encontrar una clara asociación entre los patrones de distribución de los genes de virulencia y los pulsotipos obtenidos mediante PFGE.

En coincidencia con nuestros resultados, encontramos los estudios comparativos (pulsotipo-patotipo) realizados por Someya *et al.*, (2007) que obtuvieron distintos patrones de restricción dentro de un mismo pulsotipo y Khac *et al.*, (2006), que comprobaron la existencia de patotipos diferentes dentro de un mismo pulsotipo.

Por tanto, y en coincidencia con la bibliografía consultada, nuestra conclusión más relevante en la asociación pulsotipo-patotipo, es que no podemos vincular de un modo evidente ambos parámetros. Este hecho podría deberse a la elevada variabilidad en cuanto a perfiles de restricción obtenidos, así como a la diversidad de pulsotipos incluidos en cada uno de los patotipos determinados.

4.4.2. Estudio mediante *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) de los aislados fecales

Sólo se realizó la caracterización de los aislados obtenidos tras procesar las muestras de gallinaza tomadas de naves en producción. Debido a la enorme diversidad genética obtenida, se decidió no continuar con este tipo de caracterización para el resto de aislados fecales, ya que los resultados obtenidos no nos proporcionarían mayor información que la obtenida hasta el momento. En nuestro estudio, el 87,5% de los aislamientos (28/32) pudieron ser caracterizados por este método.

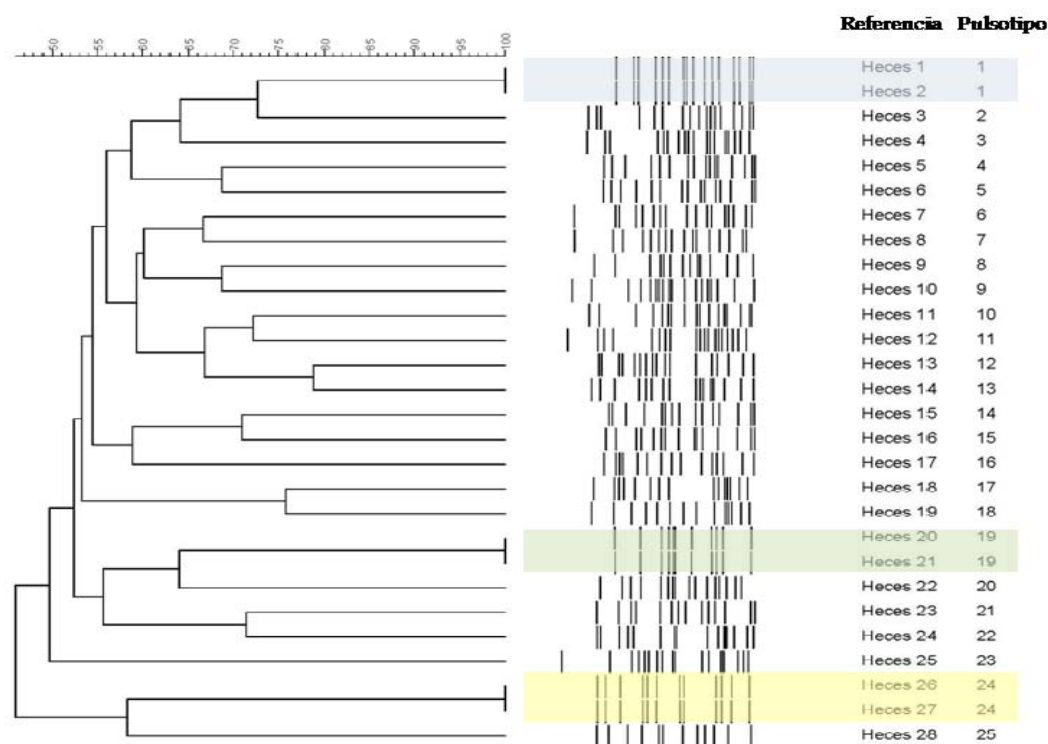
Tras la aplicación del PFGE en los 32 aislados fecales, se obtuvieron 25 patrones de restricción diferentes, 22 de ellos incluían un único aislamiento (perfiles de restricción únicos) y los 3 perfiles restantes incluían más de un aislamiento, en concreto, 6 de los 28 aislados tipables (Tabla 30). También hemos obtenido 4 aislados NT (12,5%), considerados como cepas autolíticas.

Tabla 30. Resultados obtenidos mediante PFGE en aislados fecales

<i>E. coli</i> fecales estudiados	Aislamientos tipados	Perfiles de restricción		
		Único	Múltiple	Total perfiles
32	28	22/25 (88%)	3/25 (12%)	25

Con la finalidad de intentar establecer las relaciones genéticas entre los aislados fecales de *E. coli* se elaboró un dendrograma (Figura 24) con los perfiles de restricción obtenidos, aplicando el método UPGMA.

Figura 24. Representación de los perfiles de restricción obtenidos en aislados fecales por PFGE.



El hecho de que el 88% de los pulsotipos incluyera un único aislamiento, es indicativo de una elevada heterogenicidad en los aislados fecales de *E. coli*. Igual que en los aislados clínicos, este hecho podría explicar la gran diversidad genética detectada entre los aislamientos fecales de *E. coli*.

Esta característica también ha sido demostrada por diversos autores, como Kariuki *et al.*, (1999), que tras el estudio comparativo mediante PFGE entre *E. coli* aislados de niños con cuadros clínicos de diarrea y aislados fecales de origen aviar, obtuvieron una gran diversidad de perfiles de restricción.

En concordancia con estos resultados, Renter *et al.*, (2003) obtuvieron un total de 79 perfiles de restricción diferentes a partir de 235 aislados de *E. coli* fecales y de agua.

Del mismo modo, Kawano *et al.*, (2006) determinaron un total de 29 perfiles de restricción diferentes tras procesar 30 aislados de *E. coli* de origen fecal. El 96,5% de los perfiles obtenidos (28/29) incluían una única cepa y el perfil restante (3,44%) dos. Este resultado demuestra, una vez más, la gran diversidad genética existente entre los aislados de *E. coli* fecales y la escasa utilidad de esta técnica para su caracterización.

4.4.3. Estudio de los brotes mediante las técnicas de PCR, serotipado y PFGE

Una vez finalizada la caracterización de los aislados clínicos mediante las técnicas seleccionadas en nuestro estudio, detección de factores de virulencia, determinación del antígeno somático y caracterización molecular mediante PFGE, nos propusimos realizar el análisis independiente de los brotes clínicos de colibacilosis estudiados.

Se entiende por brote al incremento de la incidencia de una enfermedad infecciosa en un lugar determinado durante un periodo de tiempo concreto, que supera el valor basal establecido (Tenover *et al.*, 1995; Real Decreto 2210/1995).

Para poder visualizar de un modo más sencillo los datos y analizar las características de cada uno de los brotes, se decidió desarrollar una fórmula en la que se representarían los resultados obtenidos mediante las técnicas utilizadas. La fórmula quedaría definida como: **PULSOTIPO/SEROGRUPO/PATOTIPO**.

De este modo, un aislado sería representado mediante una única fórmula en la que se indicarían todas las características establecidas. Así, un aislado con una fórmula del tipo **X/Y/Z**, nos indicaría que representa al pulsotipo “X”, pertenece al serogrupo “Y” y presenta un perfil de detección de factores de virulencia o patotipo “Z”.

Además de los 27 brotes indicados a continuación, integrados por un mínimo de dos aislados cada uno de ellos, hay cinco representados por un único aislamiento. Los resultados obtenidos no pueden ser comparados con los de estos brotes, y, por tanto, se ha decidido no incluirlos en el estudio comparativo.

Las Tablas 31-33 detallan los brotes clínicos de colibacilosis estudiados así como el número de *E. coli* aislados en cada uno de ellos. También, se representa cada una de las fórmulas asignadas a los brotes y el número de *E. coli* pertenecientes a cada fórmula.

Tabla 31. Detalle de las características de los brotes de colibacilosis estudiados (I)

Brote clínico	Aislamientos de <i>E. coli</i> por brote	Fórmula asignada (%)	Aislamientos de <i>E. coli</i> por fórmula
1	6	42/O78/1 (83,3%)	5
		31/O36/2 (16,6%)	1
2	6	16/O1/4 (83,3%)	5
		51/O1/4 (16,6%)	1
3	2	61/O78/1 (100%)	2
4	4	52/NT/12 (50%)	2
		52/NT/11 (25%)	1
		52/NT/6 (25%)	1
5	3	61/O78/1 (75%)	2
		61/O78/2 (25%)	1
6	2	12/O1/13 (100%)	2
7	4	3/O2/1 (25%)	1
		3/O2/23 (25%)	1
		21/ND/30 (50%)	2
8	4	23/O20/1 (75%)	3
		9/O2/1 (25%)	1
9	2	11/O20/1 (100%)	2
10	15	52/NT/12 (60%)	9
		34/O1/13 (6,7%)	1
		34/O1/35 (6,7%)	1
		66/ND/13 (20%)	3
		11/O1/13 (6,7%)	1
11	4	59/O78/13 (75%)	3
		52/NT/12 (25%)	1
12	4	56/O78/2 (75%)	3
		57/O78/2 (25%)	1

Tabla 32. Detalle de las características de los brotes de colibacilosis estudiados (II)

Brote clínico	Aislamientos de <i>E. coli</i> por brote	Fórmula asignada (%)	Aislamientos de <i>E. coli</i> por fórmula
13	4	2/ND/18 (25%)	1
		54/O9/5 (25%)	1
		60/O8/15 (25%)	1
		NT/O1/5 (25%)	1
14	2	16/O1/4 (50%)	1
		16/O1/6 (50%)	1
15	2	58/O78/15 (50%)	1
		71/ND/7 (50%)	1
16	5	53/ND/22 (20%)	1
		53/O78/13 (20%)	1
		53/O78/1 (40%)	2
		53/NT/13 (20%)	1
17	10	6/NT/8 (10%)	1
		6/NT/2 (20%)	2
		6/O103/8 (10%)	1
		29/O20/1 (10%)	1
		5/ND/10 (10%)	1
		47/ND/5 (10%)	1
		NT/ND/9 (10%)	1
		NT/O103/2 (20%)	2
18	4	18/O1/1 (25%)	1
		17/O115/11 (25%)	1
		19/O1/12 (25%)	1
		36/O8/7 (25%)	1
19	2	13/O2/1 (50%)	1
		62/O20/1 (50%)	1
20	3	68/O78/1 (33,3%)	1
		25/O20/1 (33,3%)	1
		9/O2/1 (33,3%)	1
21	7	38/O8/24 (14,28%)	1
		38/O11/10 (14,28%)	1
		55/O9/7 (14,28%)	1
		35/NT/15 (14,28%)	1
		37/O20/1 (28,5%)	2
		69/O2/1 (14,28%)	1
22	4	24/O20/1 (25%)	1
		33/NT/29 (25%)	1
		65/NT/29 (25%)	1
		49/O8/7 (25%)	1
23	2	63/ND/2 (50%)	1
		7/ND/7 (50%)	1

Tabla 33. Detalle de las características de los brotes de colibacilosis estudiados (III)

Brote clínico	Aislados de <i>E. coli</i> por brote	Fórmula asignada (%)	Aislados de <i>E. coli</i> por fórmula
24	7	10/ND/4 (42,85%)	3
		28/O88/6 (28,57%)	2
		30/O88/5 (14,28%)	1
		27/ND/6 (14,28%)	1
25	42	39/O88/2 (31%)	13
		NT/O78/1 (19%)	8
		46/ND/3 (9,52%)	4
		50/O78/1 (9,52%)	4
		40/O88/2 (7,15%)	3
		NT/O36/7 (2,38%)	1
		NT/NT/1 (7,15%)	3
		8/O88/2 (2,38%)	1
		8/ND/2 (2,38%)	1
		72/NT/2 (2,38%)	1
		15/O2/1 (2,38%)	1
		5/ND/7 (2,38%)	1
		26/O36/10 (2,38%)	1
26	10	50/O78/1 (40%)	4
		41/O88/2 (30%)	3
		48/ND/28 (10%)	1
		22/ND/7 (10%)	1
		67/ND/7 (10%)	1
27	8	46/O17/5 (25%)	2
		44/O88/2 (25%)	2
		52/ND/2 (12,5%)	1
		64/ND/7 (12,5%)	1
		43/O88/2 (12,5%)	1
		4/ND/2 (12,5%)	1

Una vez procesados los datos, se obtuvieron los siguientes resultados:

Los doce brotes clínicos indicados en la tabla 30, suponen prácticamente la mitad de los brotes estudiados, el 44,5%. Su característica común es la presencia de una cepa mayoritaria que se encuentra representada en todos los casos por un porcentaje mínimo del 50%.

Los brotes representados en la tabla 32, suponen el 14,8% de la totalidad de brotes estudiados. En todos ellos, se ha observado la existencia de una combinación de dos cepas que representan de un modo conjunto un porcentaje mayor o igual al 50% de las cepas implicadas. Resulta preciso destacar el elevado número de cepas responsables de

ciertos brotes, como en el caso del brote 25, en el que se ha determinado un total de 13 cepas diferentes (42 aislados). En este caso, solo dos de ellas suponen el 50% del total.

Por último, en la tabla 31 se detallan los once brotes restantes, que representan el 40,7% del total de brotes estudiados. Se puede observar la presencia de un elevado número de cepas implicadas, sin que exista una clara predominancia de ninguna de ellas. Por este motivo, ha sido difícil establecer una hipotética asociación entre el brote y la/s cepas más probablemente implicadas como causantes.

En concordancia con nuestros resultados, Mokady *et al.*, (2005) demuestran la existencia de diferencias importantes en cepas responsables de un mismo cuadro clínico, por tanto apoyan la idea de la implicación de varias cepas distintas.

Nuestros resultados revelan que aproximadamente el 45% de los brotes de colibacilosis estudiados se deben a una cepa mayoritaria, que se encuentra representada en todos los casos en un porcentaje mayor del 50% de los aislados. Es decir, en apariencia, los brotes de colibacilosis aviar son, en su mayoría y según nuestros datos, causados por más de una cepa, lo que va en contra de lo habitualmente aceptado en otras enfermedades.

Con todos estos resultados, se concluye una vez más, la enorme variabilidad, diversidad genética y heterogeneidad de las cepas de *E. coli* responsables de los cuadros clínicos de colibacilosis en gallinas ponedoras.

4.5. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

La colistina (COLIVET®, número de registro 10646) es según la AEMPS, el único agente antimicrobiano autorizado en avicultura de puesta frente a la colibacilosis que presenta un periodo de supresión o retirada cero en huevo. En nuestro caso, los productos (huevos) procedentes de los animales tratados, podrían seguir comercializándose con normalidad. Existen otros productos disponibles en el mercado que no poseen esta característica, y por tanto, no se utilizan.

Por este motivo, nos hemos centrado únicamente en la valoración de los perfiles de resistencia o sensibilidad a la colistina.

Nuestros resultados indican que el 100% (173/173) de los aislados clínicos de *E. coli* incluidos en este estudio presentaron un perfil de sensibilidad a la colistina.

Se han llevado a cabo numerosos estudios de prevalencia de sensibilidad y resistencia bacteriana a un elevado número de antibióticos. En la bibliografía consultada destaca la uniformidad de resultados al determinar el perfil de resistencia o sensibilidad a la colistina, coincidiendo en general con los datos obtenidos en nuestro estudio.

Blanco *et al.*, (1997), tras estudiar un total de 301 *E. coli* clínicos y 167 aislados de origen fecal (obtenidos de animales aparentemente sanos) no obtuvieron ningún aislado resistente a la colistina. En los estudios llevados a cabo por Filali *et al.*, (1988), y por Geornaras *et al.*, (2002), el porcentaje de aislamientos sensibles a la colistina fue del 100%.

Amara *et al.*, (1995), en un estudio con 258 aislados clínicos de *E. coli* obtuvieron una proporción de aislados resistentes a la colistina del 0,4%, mientras que en el estudio llevado a cabo por Giurov, (1985), el porcentaje fue del 3,94%.

Nuestros resultados, así como la bibliografía disponible, convierten a la colistina en el tratamiento de elección para la colibacilosis aviar.



CONCLUSIONES

PRIMERA

En los casos clínicos de colibacilosis con lesiones aparentes, parece indiferente la elección del órgano (hígado, pericardio, ovario, peritoneo, etc.) del que hacer el aislamiento, ya que en la mayor parte de estos casos (72,7%) se obtienen cultivos puros a partir de cualquiera de ellos.

SEGUNDA

Todos los aislados clínicos de *E. coli* incluidos en este estudio, han mostrado un perfil de sensibilidad a la colistina. Esto confirma que es el tratamiento de elección para la colibacilosis.

TERCERA

Se han encontrado una gran cantidad de patotipos, tanto entre los aislados clínicos (n=22) como entre los de origen fecal (n=25). Sin embargo, en ambos casos, existe un número limitado de patotipos que son mayoritarios. En concreto, seis patotipos abarcan el 78,7% de los aislados clínicos (de los cuales, dos patotipos representan el 51,5%), lo que parece indicar una cierta predominancia de estos patotipos entre los causantes de enfermedad.

CUARTA

La frecuencia de detección de los factores de virulencia estudiados en los aislados clínicos ha sido elevada, superior al 50% en todos los casos. En los aislados de origen fecal la detección ha sido, en general, inferior. Los patotipos en los que se han detectado cinco y seis factores de virulencia han sido los más frecuentemente obtenidos entre los aislados clínicos. Sin embargo, en los aislados de origen fecal, los patotipos en los que se han detectado dos y tres factores de virulencia han sido los más frecuentes.

QUINTA

El factor de virulencia *cvi*, ha sido detectado con una frecuencia significativamente superior en los aislados fecales que en los clínicos (90,9% frente a 62,4% respectivamente). Este hecho podría ser debido a que la producción de colicinas sea más necesaria a nivel intestinal que a nivel sistémico, como mecanismo de competencia y supervivencia intrainestinal entre diferentes cepas de *E. coli*.

SEXTA

Se ha obtenido un total de doce serogrupos diferentes, lo que revela una gran heterogeneidad. No obstante, se podría considerar la existencia de un grupo mayoritario formado por cinco, O78, O88, O1, O20 y O2, que representa el 57,8% del total de los aislados. Nuestros resultados coinciden en general con otros autores. Los serogrupos O78, O88, O20 y O2 se caracterizan por estar integrados, en su mayoría, por aislados en los que se han determinado todos los factores de virulencia estudiados (patotipo nº1) o todos excepto el factor *fyuA* (patotipo nº 2).

SÉPTIMA

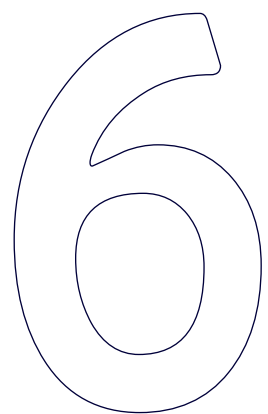
Los resultados de la técnica de PFGE reflejan una alta heterogeneidad. En los aislados de origen clínico, el 61,1% de los pulsotipos obtenidos está integrado por una única cepa. Lo mismo sucede con los aislados de origen fecal, donde el 88% de los pulsotipos incluyen una única cepa. En general, nuestros resultados coinciden con la bibliografía consultada.

OCTAVA

Todas las técnicas empleadas en este estudio, han producido resultados altamente heterogéneos. Los discretos agrupamientos sólo se corresponden parcialmente entre sí, por lo que parece recomendable el uso de varias técnicas para caracterizar con garantías a un aislado.

NOVENA

Aproximadamente el 45% de los brotes clínicos estudiados, se deben a una cepa mayoritaria, que representa en cada uno de los casos un porcentaje mayor del 50% de los aislados. Por tanto, los brotes de colibacilosis aviar son en su mayoría y según nuestros datos, causados por más de una cepa.



RESUMEN

Objetivos del estudio

El objetivo de esta tesis ha sido realizar la caracterización de aislados de *E. coli* clínicos (responsables de cuadros de colibacilosis en gallinas ponedoras) y fecales. Tras llevar a cabo el aislamiento e identificación bioquímica de los aislados, se ha procedido a la determinación del serogrupo, patotipo (detección de factores de virulencia por PCR), sensibilidad a antimicrobianos y pulsotipo (mediante la técnica de *Pulsed Field-Gel Electrophoresis*, PFGE). Además, se ha realizado un estudio comparativo con aislados de origen fecal, en cuanto a la presencia de genes de virulencia y la caracterización molecular.

Resultados y conclusión

- Tras la determinación de la presencia de los factores de virulencia seleccionados, el 78% de los aislados clínicos se agrupó en seis perfiles diferentes (patotipos), si bien existe una elevada heterogeneidad. La característica común ha sido la implicación de un elevado número de factores de virulencia, que en el caso de los aislados clínicos ha sido superior a los de origen fecal.

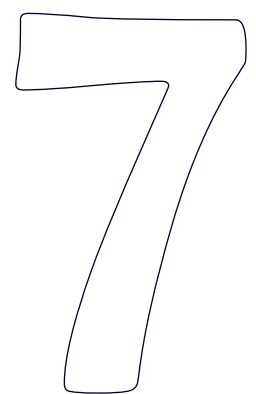
- El 57,8% de los aislados se englobaron en un grupo mayoritario formado por cinco serogrupos (O78, O88, O1, O20 y O2). La correlación serogrupo-patotipo ha sido difícil de establecer debido a la gran variabilidad obtenida.

- La caracterización molecular de los aislados clínicos mediante PFGE ha revelado la existencia de un elevado número de perfiles de restricción diferentes, incluso dentro de un mismo brote. Así mismo, los resultados obtenidos tras la caracterización molecular de los aislados fecales confirma la elevada diversidad genética detectada.

- Por otro lado, la totalidad de aislados clínicos mostró un perfil de sensibilidad a la colistina, único antimicrobiano autorizado en avicultura de puesta frente a *E. coli*.

La conclusión más relevante que se puede extraer de los resultados obtenidos, es la elevada diversidad y heterogeneidad de las cepas responsables de los cuadros clínicos de colibacilosis. Los brotes de colibacilosis estudiados se deben, en aproximadamente el

45% de los casos, a una cepa mayoritaria, que representa un porcentaje mayor del 50% de los aislados. Por tanto, los brotes de colibacilosis aviar son en su mayoría y según nuestros datos, causados por más de una cepa.



SUMMARY

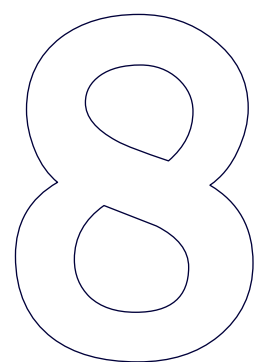
Objectives

The main objective of this study was the characterization of clinical (causing colibacillosis in laying hens) and faecal *E. coli* isolates. After performing the isolation and biochemical identification of the strains, analysis of serogroup, antimicrobial sensitivity, patotype (detection of virulence factors by PCR) and pulsotype (using *Pulsed Field-Gel Electrophoresis*, PFGE) was carried out. Furthermore, presence or absence of virulence factors and molecular characterization were analyzed by a comparative study with faecal isolates.

Results and conclusion

- The study of the presence of previously selected virulence factors showed that the 78% of the clinical isolates were grouped in six different profiles (patotypes), although there was a high heterogeneity. A common feature was the involvement of a high number of virulence factors (it was more marked in the clinical isolates).
- 57,8% of the isolates were included in a main group constituted by five serogroups (O78, O88, O1, O20 y O2). The serogroup-patotype correlation was difficult to establish because of the high variability obtained.
- Molecular characterization of the clinical isolates using PFGE revealed the existence of a high number of different restriction patterns, even in the same outbreak. Molecular characterization of faecal isolates showed a high genetic diversity.
- All the clinical isolates were sensitive to colistin, the only antimicrobial allowed to be prescribed in laying hens against *E. coli*.

The main conclusion extracted from the results is the high diversity and heterogeneity of the strains responsible of clinical colibacillosis. Approximately 45% of the outbreaks were caused by a majority strain which represents more than the 50% of the isolates. Therefore, basing our conclusion on the results of this study we can affirm that avian colibacillosis outbreaks are caused by more than one strain.



BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, F., Andreasen, J. R., Jackwood, M., "Development of a polymerase chain reaction and a nonradioactive DNA probe for infection Laryngotracheitis virus" *Avian Diseases*, 1996, 40: 56-62.
- Achman, M., Pluschke, G., "Clonal analysis of descent and virulence among selected *Escherichia coli*" *Annual Review of Microbiology*, 1986, 40: 185-210.
- Aguëro, M. E., and Cabello, F. C., "Relative contribution of ColV plasmid and K1 antigen to the pathogenicity of *Escherichia coli*" *Infection and Immunity*, 1983, 359-368.
- Al-Ghamdi, M. S., El-Morsy, F., Al-Mustafa, Z. H., Al-Ramadhan, M., Hanif, M., "Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry workers, patients and chicken in the eastern province of Saudi Arabia" *Tropical Medicine and International Health*, 1999, 4 (4): 278-83.
- Alexander, D. J., Manvell, R. J., Lowings, J. P., Frost, K. M., Collins, M. S., Russell, P. H. and Smith, J. E., "Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolated using monoclonal antibodies" *Avian Pathology*, 1997, 26 (2): 399-418.
- Alexander, D. J., "Newcastle Disease" 11th edition *Disease of Poultry*, 2003, Section I, Chapter 2.
- Allan, B. J., van den Hunk, J., and Potter, A. A., "Characterization of *Escherichia coli* isolates from cases of avian colibacillosis" *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1993, 57: 146-151.
- Alonso, P., "El desafío de salmonelas zoonóticas para el sector de avicultura de puesta" *Jornadas profesionales de avicultura*, 2007, Guadalajara, 37-41.
- Amara, A., Zakia, Z., and Bouzoubaa, K., "Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated in Morocco from chickens with colibacillosis" *Veterinary Microbiology*, 1995, 43: 325-330.
- Bagust, T. J. and Johnson, M. A., "Avian infectious laryngotracheitis: virus-host interactions in relation to prospects for eradication" *Avian Pathology*, 1995, 24: 373-391.
- Barnes, H. J., Gross, W. B., 1997 "Colibacillosis". *Diseases of poultry*, 9 ed.

- Barnes, H. J., Vaillancourt, J. P., Gross, W. B., "Colibacillosis" Diseases of Poultry, 2003, 11th Edition, Section II, Chapter 18.
- Barrow, G. I. and Feltham, R. K. A., Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 1993, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Beery, J. T., Doyle, M. P., and Schoeni, J. L., "Colonization of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis" Applied and Environmental Microbiology, 1985, 310–315.
- Bencina, D., Narat, M., Bidovec, A., Zorman-Rojs, O., "Transfer of maternal immunoglobulins and antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* to the allantoic and amniotic fluid of chicken embryos" Avian Pathology, 2005, 34 (6): 463-472.
- Berchieri, A. Jr., Wigley, P., Page, K., Murphy, C. K., Barrow, P.A., "Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* phage type 4 in chickens" Avian Pathology, 2001, 30: 297-310.
- Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S., Scheutz, F., "Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like-toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals" Journal of Clinical Microbiology, 1993, 2483-2488.
- Beutin, L., "E. coli as a pathogen in dogs and cats" Veterinary Research, 1999; 30 (2-3): 285-98.
- Biarnés, M., "Micoplasmosis, Coriza y Colibacilosis" Higiene y patología aviar, 2006, capítulo 5, Real Escuela de Avicultura, 2^a edición.
- Bisgaard, M., and Dam, A., "Salpingitis in poultry II: prevalence, bacteriology and possible pathogenesis in egg-laying chickens". Nordisk Veterinær Medicin, 1981, 33(2): 81-9.
- Blackell, P. J., and Matsumoto, M., "Infectious Coriza" 11th edition Disease of Poultry, 2003, Section II, Chapter 20.
- Blanco, J., Alonso, M. P., Blanco, M., Gonzalez, E. A., "Mecanismo de patogénesis de los *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales" Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica, 1991, 6: 163-176.

- Blanco, M., Blanco, J., Blanco, J.E., Ramos, J., "Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain" American Journal of Veterinary Research, 1993, 54 (9): 1446-51.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Blanco, J., "*Escherichia coli* septicémicos aviares: serotipos, factores de virulencia, resistencia a antibióticos y desarrollo de vacunas" Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela (LUGO). Medicina Veterinaria, 1996a, vol. 13 n° 10.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Blanco, J., Gonzalez, E. A., Alonso, M. P., Maas, H., Jansen, W. H., "Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain)" European Journal of Epidemiology, 1996b, 12 (1): 13-9.
- Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A., Croas, C., Blanco, J., "*Escherichia coli* septicémicos aviares: problemática en España" Medicina Veterinaria, 1996c, 13: 680-686
- Blanco, J., Blanco, M., Mora, A. and Blanco, J., "Prevalence of Bacterial Resistance to quinolones and other antimicrobials among Avian *Escherichia coli* Strain isolated from septicemic and healthy chickens in Spain" Journal of clinical Microbiology, 1997a, 2184-2185.
- Blanco, J., Blanco, M., Mora, A., and Blanco, J., "Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity" Journal of Clinical Microbiology, November 1997b, 2956-2957.
- Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A., Cansen, W., García, V., Vázquez, M., Blanco, J., "Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (Northwest Spain) Veterinary Microbiology, 1998, 61: 229-235.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Alonso, M. P., González, E. A., and Bernárdez, M. I., "Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*" Manual de Microbiología Veterinaria, S. Vadillo, S. Píriz and E. Mateos, 2002, capítulo 21: 301-325.
- Blanco, M., Lazo, L., Blanco, J. E., Dahbi, G., Mora, A., López, C., González, E. A., and Blanco, J., "Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of Enteropathogenic

- Escherichia coli* isolated from Cuban pigs with diarrhea" International Microbiology, 2006, 9:53-60.
- Bolin, C. A., "Effects of exogenous iron on *E. coli* septicaemia in Turkeys" American Journal of Veterinary Research, 1986, 47: 1813-1816.
 - Brée, A., Dho, M., Lafont, J. P., "Comparative infectivity for axemic and specific pathogen-free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors" Avian Diseases, 1989, 33:134-139.
 - Buxadé, C., "La gallina ponedora" 2000, 2ª Edición.
 - Calnek, B. W., "Avian Encephalomyelitis". 11th edition Disease of Poultry, 2003, Section 1, Chapter 10.
 - Capua, I., Mutinelli, F., Bozza, M.A., Terregino, C. and Cattoli, G. "Highly pathogenic avian influenza (H7N1) in ostriches (*Struthio camelus*)" Avian Pathology, 2000, 29: 643-646.
 - Capua, I., Alexander, D. J., "Avian influenza: recent developments" Avian Pathology, 2004, 33 (4): 393-404.
 - Caugant, D. A., Levin, B. R., Orskov, I., Orskov, F., Svanborg Eden, C., Selander, R. K., "Genetic diversity in relation to serotype in *Escherichia coli*" Infection and Immunity, 1985, 49: 407-413.
 - Cavanagh, D. and Naqi, S. A., "Infectious Bronchitis" 11th Edition Disease of Poultry, 2003, Section I, Chapter 3.
 - Chansiripornchai, N., Ramasoota, P., Sasipreeyajan, J., Svenson, S. B., "Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis" Veterinary Microbiology, 2001, 80: 75-93.
 - Chen, X., Chen, Q., Zhang, P., Feng, W. and Blackall, P. J., "Evaluation of a PCR test for the detection of *Haemophilus paragallinarum* in China" Avian Pathology, 1998, 27 (3): 296-300.
 - Cherifi, A., Contrepolis, M., Picard, B., Gouillet, P., Orskov, I., Orskov, F., "Clonal relationships among *Escherichia coli* serogroup O78 isolates from human and animal infections" Journal of Clinical Microbiology, 1994, 32 (5): 1197-202.

- Cheville, N. F., Arp, L. H., "Comparative pathologic findings of *Escherichia coli* infections in birds" Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA), 1978, 173: 584-587.
- Chirinos, B., Icochea, E., Gavidia, C., and Noé, N. "Evaluación de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación vs. ELISA para la determinación de anticuerpos contra *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*". Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 2000, 11(1): 40-44.
- Christensen, N. H., Yavari, C. A., McBain, A. J., and Bradbury, J. M., "Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment" Avian Pathology, 1994, 23: 127-143.
- Christensen, J. P and Bisgaard, M., "Fowl Cholera" Revue Scientifique et technique, 2000, 19 (2): 626-37.
- Cloud, S. S., Rosenberger, J. K., Fries, P. A., Wilson, R. A., and Odor, E. M., "In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*: serotypes, metabolic activity, and antibiotic sensitivity". Avian Diseases 1985, 29: 1084-1093.
- Cortes, M. C., "El ganado caprino como reservorio de bacterias enteropatógenas potencialmente zoonóticas" Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, UCM, 2007.
- Crespo, P. S., Portero, R. C., Usera, M. A., Ontañón, S., "Especificidad de los sistemas de vigilancia de la salud pública: diagnóstico de *E. coli* verotoxigénico en España" Boletín Epidemiológico Semanal, 1998, Vol. 6, nº 4: 37-48.
- Coimbra, R. S., Grimont, F., Lenormand, P., Burguiere, P., Beutin, L., Grimont, P., "Identification of *Escherichia coli* O-serogroups by restriction of the amplified O-antigen gene cluster (rfb-RFLP)" Research in Microbiol, 2000, 151: 639-654.
- D'Aoust, J. Y. 1997. *Salmonella* Species. En *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*. Edited by Doyle, M. P., Beuchat, L. R., and Montville, T. J. Washington D.C.
- Davis, M. A., Hancock, D. D., Besser, T. E., Call, D. R., "Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7" Journal of Clinical Microbiology, 2003, 1843-1849.

- De Luna, C., Arkle, S., Harrington, D., George, D., Guy, J., and Sparagano, O., "The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* as a potential carrier of vector-borne diseases" *Annals of the New York Academy of Science*, 2008, 1149: 255-258.
- Deb, J. R., Harry, E. G., "Laboratory trials with inactivated vaccines against *Escherichia coli* (O2:K1) infection in fowls" *Research in Veterinary Science*, 1979, 24: 308-313.
- Delicato, E. R., Guimaraes de Brito, B., Gaziri L. C. and Vidotto, M. C., "Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis" *Veterinary Microbiology*, 2003, 94: 97-103.
- Da Silveira, W., Ferreira, A., Brocchi, M., de Hollanda, L. M., Pestana de Castro, A., Tatsumi Yamada, A. and Lancellotti, M., "Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains" *Veterinary Microbiology*, 2002, 85: 47-53.
- Dhondt, A., Dhondt, K., Hawley, D., Jenelle, C., "Experimental evidence for transmission of *Mycoplasma gallisepticum* in house finches by fomites" *Avian Pathology*, 2007, 36 (3): 205-208.
- Dho-Moulin., Lafont J. P., "*Escherichia coli* colonization of the trachea in poultry: comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens" *Avian Diseases*, 1982, 26 (4): 787-97.
- Dho-Moulin, M., "Les *Escherichia coli* pathogènes des volailles." *Annales de Médecine Vétérinaire*, 1993, 137, 353-357.
- Dho-Moulin, M., and Fairbrother, J. M., "Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)" *Veterinary Research*, 1999, 30 (2-3): 299-316.
- Dho-Moulin, M., Schouler, C., Tailliez, P., Kao, Mu-Rong., Bree, A., Germon, P., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, M., and Blanco, J., "Common Virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin" *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 3484-3492.
- Dho-Moulin, D., Répérant, M., Laurent, S., Brée, A., Mignon, S., Germon, P., Rasschaert, D and Schouler C., "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns" *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, Vol. 45, No. 10: 3366-3376.

- Doetkott, D. M., Nolan, L. K., Giddings, C. W. and Berryhill "Large plasmids of avian *Escherichia coli* isolates" *Avian Diseases*, 1996, 40: 927-930.
- Dozois C. M., Fairbrother J. M., Harel, J., and Bossé, M., "pap and pil related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys" *Infection and Immunity*, 1992, 60: 2648-2656.
- Dozois, C. M., Chanteloup, N., Dho-Moulin, M., Bree, A., Desautels, C., and Fairbrother, J. M., "Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (Type-1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*" *Avian Diseases*, 1994, 38: 231-239.
- Dozois C. M., Pourbakhsh, S. A., Fairbrother J. M., "Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in Pathogenic *Escherichia coli* from poultry" *Veterinary Microbiology*, 1995, 45: 297-309.
- Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Breé, A., Fairbrother, J. M., Desautels, C., and Curtis, R., "Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region" *Infection and Immunity*, 2000, 4145-4154.
- Dunkley, K. D, Callaway, T. R, Chalova, V. I., McReynolds, J. L., Hume, M. E., Dunkley, C. S., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., Ricke, S. C., "Foodborne *salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract" *Anaerobe*, 2008.
- Ellis, M. G., Arp, L. H., Lamont, S. J., "Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from turkeys" *American Journal of Veterinary Diseases*, 1988, 49: 2034-2037.
- Ericsson, H. M., Sherris, J. C. "Antibiotic sensitivity testing" *Microbiology and Immunology*, 1971, 217: 4-8.
- Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H., Vernozzy-Rozand, C., "Escherichia coli O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese" *Epidemiology and Infection*, 2006, 134 (1): 143-146.
- Esteban, M. A. "Papel del avicultor en el control de la salmonelosis" *Jornadas Profesionales de avicultura 2008- Aranda de Duero*, p. 5-19.
- Ewers, C., Janben, T., and Wieler, L. H., "Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC)" *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 2003, 116: 381-395.

- Ewers, C., Janben, T., Kiebling, S., Philipp, H. C., Wieler, L. H., "Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia en poultry" *Veterinary Microbiology*, 2004, 104: 91-101.
- Ewers, C., Janben, T., Kiebling, S., Philipp H. C., and Wieler, L. H., "Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction" *Avian Diseases*, 2005, 49:269-273.
- Fadly, A. M., "Isolation and identification of avian leukosis viruses: a review" *Avian Pathology*, 2000, 29: 529-535.
- Fadly, A. M., and Payne, L. N., "Neoplastic Diseases" 11th Edition *Disease of Poultry*, 2003, Section I, Chapter 15.
- Feder, I., Wallace, F. M., Gray, J. T., Fratamico, P., Fedorka-Cray, P. J., Pearce, R. A., Call, J. E., Perrine, R., Luchansky, J. B., "Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from intact colon fecal samples of swine" *Emerging Infectious Diseases*, 2003, 9(3): 380-3.
- Fenton, S. P., Reddy, M. R., and Bagust, T. J., "Single and concurrent avian leukosis virus infection with avian leucosis virus-J and avian leukosis virus-A in Australian meat-type chickens" *Avian Pathology*, 2005, 34(1): 48-54.
- Ferreira, A. J. P., Silva, E. N., "Pathogenicity factors of chicken *Escherichia coli* strains: comparative study among pathogenic and apathogenic strains." In: *Proceedings of the 128th Annual Meeting of American Veterinary Medical Association/ American Association of Avian Pathologist (AVMA AAAP)*, Seattle, WA, 1991, 135-136
- Filali, E., Bell, J. G., Houadfi, M. E. I., Huggens, M. B., Cook, J. K., "Antibiotic resistance of *Escherichia coli* strain isolated from chickens with colisepticemia in Morocco" *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 1988, 11: 121-124.
- Fisher, M. E., Trampel, D. W., and Griffith, R. W., "Postmortem detection of acute septicaemia in broilers" *Avian Diseases*, 1998, 42(3): 452-61.
- Foley, S. L., Horne, S. M., Giddings, C. W., Robinson, M., and Nolan, L. K., "Iss from a virulent avian *Escherichia coli*" *Avian Diseases*, 2000, 44(1): 185-91.
- Frommer, A., Freidlin, P., Bock, R., Drabkin, N., Samberg, Y., "Adherence-associated characteristics and pathogenicity of *Escherichia coli* from avian colibacillosis" *Avian Pathology*, 1990, 19: 547-554.

- Gantois, I., Eeckhaut, V., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., "A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of salmonella" *Avian Pathology*, 2008a, 37(4): 399-406.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., "Salmonella enteritidis genes induced during oviduct colonization and egg contamination in laying hens" *Applied and Environmental Microbiology*, 2008b.
- Garaizar, J., López-Molina, N., Laconcha, I., Baggesen, D. L., Rementeria, A., Vivanco, A., Audicana, A., Perales, I., "Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR, and Pulsed-field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of Salmonella enterica serovar Enteritidis" *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (12): 5273-5281.
- García, A., Romo, F., Ortiz, A. M., Blackall, P. J., "The vaccination-challenge trial: the gold standard test to evaluate the protective efficacy of infectious coryza vaccines" *Avian Pathology*, 2008, 37 (2): 183-186.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. G. "Taxonomic outline of the Prokaryotes". In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition* (2004).
- Geornaras, I., Hastings, J. W., von Holy, A., "Genotypic analysis of Escherichia coli strains from poultry carcasses and their susceptibilities to antimicrobial agents" *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (9): 4698.
- Ginns, C. A., Browning, G. F., Benham, M. L., Anderson, G. A., and Whithear, K. G., "Antimicrobial resistance and epidemiology of Escherichia coli in broiler breeder chickens" *Avian Pathology*, 1996, 25: 591-605.
- Giovanardi, D., Campagnari, E., Ruffoni, L. S., Pesente, P., Ortali, G., and Furlattini, V., "Avian pathogenic Escherichia coli transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain" *Avian Pathology*, 2005, 34 (4): 313-8.
- Giurov, B., "Sensitivity to drugs of Escherichia coli strains isolated from poultry with colisepticemia" *Vet. Med. Nauki*. 1985; 22(5):16-24.
- Glunder, G., "Dermatitis in broilers caused by Escherichia coli: isolation of Escherichia coli from field cases, reproduction of the disease with Escherichia coli O78:K80 and

- conclusions under consideration of predisposing factors" *Journal of Veterinary Medicine*, 1990; B37: 383-391.
- González, E. A., Blanco, J., Baloda, S. B. Fröman, G., Dho-Moulin, M., Lafont, J. P., Wadström, T., "Virulent *Escherichia coli* strains for chicks bind fibronectin and Type II collagen" *Microbios*, 1990, 62: 113-127.
 - Gohm, D. S., Thur, B., Hofmann, M. A., "Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR" *Avian Pathology*, 2000, 29:143-152.
 - Gomis, S. M., Riddell, C., Potter, A. A., Allan, B. J., "Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions" *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 2001, 65: 1-6.
 - Gomis, S. M., Watts, T., Riddell, C., Potter, A. A., and Allan, B. J., "Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicaemia in broiler chickens" *Avian Diseases*, 1997, 41(1): 234-40.
 - Gough, R. E. "Avian Pneumoviruses" *Diseases of Poultry*, 11th edition, Section I, Chapter 2, 2003.
 - Gough, R. E., "Newcastle Disease, other Paramyxoviruses and Pneumovirus" 11th Edition *Disease of Poultry*, 2003, Section I, Chapter 2.
 - Gross, W. B., "The role of *Escherichia coli* in the cause of chronic respiratory disease and certain other respiratory diseases" *Journal of Veterinary Research*, 1958, 19, 448-452.
 - Gross, W. B., Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W., Reid, W. M., Yoder, H. W., "Colibacillosis" *Diseases of poultry*, 9 ed. Ames: Iowa States University Press, 1991, 138-144.
 - Gross, W. B., Domermuth, C. H., "Isolation and identification of Avian pathogens" 2nd Edition. American Association of Avian Pathology, USA, 1980, 9-10.
 - Gross, W. B., Siegel, P. B., "Coliform peritonitis of chickens" *Avian Diseases*, 1959, 3: 370-373.

- Gross, W. G., "Diseases due to *Escherichia coli* in poultry" in: Gyles C. L. (Ed), *Escherichia coli* in domestic animals and humans, CAB International, Wallingford, 1994, 237-259.
- Guinée, P. A. M., Agterberg, C. M., and Jansen, W. H., "*Escherichia coli* O antigen typing by means of a mechanized microtechnique" *Applied Microbiology*, 1972, 127-131.
- Guy, J. S., Barnes, H. J. and Smith, L., "Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage" *Avian Diseases*, 1991, 35, 348-355.
- Guy, J. S., and Bagust, T. J., "*Laryngotracheitis*" 11th Edition *Disease of Poultry*, 2003, Section I, Chapter 4.
- Gyles, G. L., *Escherichia coli* in: Gyles C.L., Thoen C. O. (Eds.), *Pathogenesis of bacterial infections in animals*, 2nd ed., Iowa State University Press, Ames, 1993, 164-187.
- Gymah, J. E., Panigrahy, B., Williams, J. D., "Immunogenicity of an *Escherichia coli* multivalent pilus vaccine in chickens" *Avian Diseases*, 1986, 30: 687-689.
- Gymah, J. E., Panigrahy, B., "Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of pathogenic *Escherichia coli* to chickens tracheal epithelium" *Avian Diseases*, 1988, 32: 74-78.
- Hailemariam, Z., Omar, A. R., Hair-Bejo, M., Giap, T. C., "Detection and characterization of chicken anemia virus from commercial broiler breeder chickens" *Virology Journal*, 2008, 5:128.
- Hall, A. J., and Saito, E. K., "Avian wildlife mortality events due to salmonellosis in the United States, 1985-2004" *Journal of Wildlife disease*, 2008, 44(3): 585-593.
- Higiene y Patología Aviar" Real Escuela de Avicultura, 2^a edición, Junio 2006.
- Hodgson, T., Casais, R., Britton, P., and Cavanagh, D., "Recombinant infectious bronchitis coronavirus with the spike protein gene of the pathogenic M41 strain remains attenuated but induces good protective immunity" *Journal of Virology*, 2004, 78, 13804-13811.
- Hoop, R. K., "Persistence and vertical transmission of chicken anaemia agent in experimentally infected laying hens" *Avian Pathology*, 1992, 21: 493-501.

- Horne, S. M., Pfaff-McDonough, S. J., Giddings, C. W. and Nolan, L. K., "Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent avian *Escherichia coli*" *Avian Diseases*, 2000, 44: 179-184.
- Iguchi, A., Osawa, R., Kawano, J., Shimizu, A., Terajima, J., and Watanabe, H., "Effect of repeated subculturing and prolonged storage at room temperature of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on Pulsed-Field Gel Electrophoresis profiles" *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 3079-3081.
- Ike, K., Kawahara, K., Danbara, H., and kume, K., "Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* mediated by conjugative 100-megadalton plasmid". *Journal of Veterinary Medical Science*, 1992, 54 (6): 1091-8.
- Informaciones sanitarias "Influenza Aviar España" Subdirección General de Sanidad Animal. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2008.
- Jackwood, D. H., and Saif, Y. M., "Antigenic diversity of infectious bursal disease" *Avian Diseases*, 1987, 31: 766-770
- Janssen, T., Schwarz, C., Preikschat, P., Voss, M., Philipp, H. C., Wieler, L. H., "Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis" *International Journal of Medical Microbiology*, 2001, 291 (5): 371-8.
- Jeffrey, J. S., Nolan, L. K., Tonooka, K. H., Wolfe, S., Giddings, C. W., Horne, S. M., Foley, S. L., Lynne, A. M., Ebert, J. O., Elijah, L. M., Bjorklund, G., Pfaff-McDonough, S. J., Singer, R. S., and Dortkott, C., "Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens" *Avian Diseases*, 2002, 46: 48-52.
- Johnson, T. J., Giddings, C. W., Horne, S. M., Gibbs, P. S., Wooley, R. E., Skyberg, J., Olah, P., Kercher, R., Sherwood, J. S., Foley, S. L., and Nolan, L. K., "Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolates." *Avian Diseases*, 2002, 46(2): 342-52
- Johnson, T. J., Skyberg, J., and Nolan, L. K., "Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis" *Avian Diseases*, 2004, 48 (2): 351-60.

- Johnson, T. J., Siek, K., E., Johnson, S., and Nolan, L. K., "DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains" *Journal of Bacteriology*, 2006a, 745-758.
- Johnson, J. R., Clermont, O., Kuskowski, M., Menard, M., Picard, B., and Denamur, E., "Experimental Mouse Lethality of *Escherichia coli* Isolates, in Relation to Accessory Traits, Phylogenetic Group, and Ecological Source". *Journal of Infectious Diseases*, 2006b, 194: 1141-1150.
- Jordan, F. T., Williams, N. J., Wattret, A., and Jones, T., "Observations on salpingitis, peritonitis and salpingoperitonitis in a layer breeder flock". *The Veterinary Record*, 2005, 157(19): 573-7.
- Kariuki, S., Gilks, C., Kimari, J., Obanda, A., Muyodi, J., Waiyaki, P., and Hart, A., "Genotype analysis of *Escherichia coli* strains isolated from children and chickens living in close contact" *Applied and Environmental Microbiology*, 1999a, 472-476.
- Kariuki, S., Cheesbrough, J., Mavridis, A. K., and Hart, C. A., "Typing of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi C isolates from various countries by plasmid profiles and Pulsed-Field Gel Electrophoresis" *J.Clin.Microbiol.* 1999b, 37 (6): 2058-2060.
- Kariyawasam, S., Wilkie, B. N., Hunter, D. B., Gyles, C. L. "Systemic and mucosal antibody responses to selected cell surface antigens of avian pathogenic *Escherichia coli* in experimentally infected chickens" *Avian Diseases*, 2002, 46: 668-678
- Karmali, M. A., "Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*" *Clinical Microbiology Reviews*, 1989, 2:15-38.
- Kauffmann, F., "The Bacteriology of *Enterobacteriaceae*" Munksgaard, 1966, Copenhagen.
- Kawano, M., Yaguchi, K., and Osawa, R., "Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chicken with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan" *Microbiology and Immunology*, 2006, 50 (12): 961-966.
- Kempf, I., Blanchard, A., Gesbert, F., Guittet, M., and Bennejean, G., "The polymerase chain reaction for *Mycoplasma gallisepticum* detection" *Avian Pathology*, 1993, 22: 739-750.
- Khac, H. V., Holoda, E., Pilipcinec, E., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Dahbi, G., López, C., González, E. A., and Blanco, J., "Serotypes, virulence genes, and PFGE

- profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia" Veterinary Research, 2006, 2:10.
- Kirkpatrick, N. C., Mahmoudian, A., Colson, C. A., Devlin, J. M., and Noormohammadi, A. H., "Relationship between mortality, clinical signs and tracheal pathology in infectious laryngotracheitis" Avian Pathology, 2006, 35 (6): 449-453.
 - Kleven, S. H., "Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease" Poultry Science, 1998, 77:1146-1149.
 - Knöbl, T., Baccaro, M. R., Moreno, A. M., Gomes T. A., Vieira, M. A., Ferreira, C. S., and Ferreira, J. A., "Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease" Veterinary Microbiology, 83:71-80.
 - Knöbl, T., Tardelli, T., Midolli, M., Bottino, J. A., and Piantino, A. J., "Detection of pap, sfa, afa and fim adhesin-encoding operons in avian pathogenic *Escherichia coli*" The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine, 2004, vol. 2 n° 2.
 - Kotiw, M., Wilks, C. R., and May, J. T., "The effect of serial in vivo passage on the expression of virulence and DNA stability of an infectious laryngotracheitis virus strain of low virulence" Veterinary Microbiology, 1995, 45: 71-80.
 - Kwaga, J. K. P., Allan, B. J., van den Hunk, J. V., Seida, H., and Potter, A. A., "A *carAB* mutant of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O2 is attenuated and effective as a live oral vaccine against colibacillosis in turkeys" Infection and Immunity, 1994, 62: 3766-3772.
 - La Ragione, R. M., Sayers, A. R., and Woodward, M. J., "The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78:K80 in the day-old-chick model" Epidemiology and Infection, 2000, 24: 351-363.
 - La Ragione, R. M., and Woodward, M. J., "Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticemia" Research in Veterinary Science, 2002, 73: 27-35.
 - Lafont, J. P., Dho-Moulin, M., Hauteville, H. M., Brée, A., and Sansonetti, P. J., "Presence and expression of aerobactin genes in virulent avian strains of *Escherichia coli*" Infection and Immunity, 1987, 55: 193-197.

- Landman, W. J., and Cornelissen, R. A., “*Escherichia coli* salpingitis and peritonitis in layer chickens: an overview” *Tijdschr Diergeneeskd*, 2006, 15; 131(22): 814-22.
- Landman, W. J., and Cornelissen, R. A., “Virulence factors of *Escherichia coli*, with emphasis on avian pathogenic isolates” *Tijdschr Diergeneeskd*, 2006, 15; 131(22): 822-30.
- Lasher, H. N., and Shane, S. M., “Infectious bursal disease” *World’s Poultry Science Journal*, 1994, 50.
- Leitner, G., and Heller, E. D., “Colonization of *Escherichia coli* in young turkeys and chickens” *Avian Diseases*.1992. 36: 211-220.
- Le Minor, L., “The genus *Salmonella*” In *The Prokaryotes*. Vol. III. Edited by Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H. New York, (1992).
- Leotta, G. A., Chinen, I., Vigo, G. B., Pecoraro, M., and Rivas, M., “Outbreaks of avian cholera in Hope Bay, Antarctica”. *Journal of Wildlife Disease*, 2006; 42(2): 259-70.
- Levine, M. M., “*Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent” *Journal of Infection Diseases*, 1987, 155: 377-389.
- Ley, D. H., “Mycoplasmosis” 11th Edition *Disease of Poultry*, 2003, Section II, Chapter 22.
- Liébana, E., Guns, D., García-Migura, L., Woodward, M. J., Clifton-Hadley, F., and Davies, R. H., "Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology" *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(10): 3609-3616.
- Linggood, M. A., Roberts, M., Ford, S., Parry, S. H., Santos, D. S., “Incidence of the aerobactin iron uptake system among *Escherichia coli* isolates from infections of farm animals” *Journal of General Microbiology*, 1987; 133: 835-842.
- Liu, S., Chen, J., Han, Z., Zhang, Q., Shao, Y., Kong, X., and Tong, G., “Infectious bronchitis virus: S1 gene characteristics of vaccines used in China and efficacy of vaccination against heterologous strains from China” *Avian Pathology*, 2006, 35(5): 394-399.
- Lukert, P. D., and Saif, Y. M., “Gumboro Disease” 11th Edition *Disease of Poultry*, 2003, Section I, Chapter 6.

- Nagi, M. S., and Mathey, W. J., "Interaction of *Escherichia coli* and *Eimeria burnetti* in chickens" *Avian Diseases*, 1972, 16: 864-873.
- Nair, V., "Evolution of Marek's Disease: a paradigm for incessant race between the pathogen and the host" *Veterinary Journal*, 2005, 170(2): 175-83.
- Nakamura, K., Maeda, M., Imada, Y., Imada, T., and Sato K., "Pathology of spontaneous colibacillosis in a broiler flock" *Veterinary Pathology*, 1985, 22(6): 592-7.
- Nakamura, K., Yuasa, N., Abe, H., and Narita, M., "Effect of infectious bursal disease virus on infections produced by *Escherichia coli* of high and low virulence in chickens" *Avian Pathology*, 1990, 19 (4): 713-721.
- Nakamura, K., Narita, M., Imai, K., Matsumura, T., Maeda, M., Tanimura, T., "The effect of mixed live vaccines of Newcastle disease and infectious bronchitis on the chicken respiratory tract" *Journal of Comparative Pathology*, 1992b, 106: 341-350.
- Nakamura, K., Cook, J. K. A., Frazier, J. A., and Narita, M., "*Escherichia coli* multiplication and lesions in the respiratory tract of chickens inoculated with infectious bronchitis virus and/or *Escherichia coli*." *Avian Diseases*, 1992a, 36: 881-890.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B., "Diarrheagenic *Escherichia coli*" *Clinical Microbiology Reviews*, 1998, 11: 142-201.
- Nazarowec-White M., Farber, J.M. "Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*" *Journal of Medical Microbiology*, 1999, 48(6): 559-67.
- Ngeleka, M., Brereton, L., Brown, G., Fairbrother, J. M., "Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers". *Avian Diseases*, 2002; 46(1): 143-152.
- Ngeleka, M., Kwaga, J., White, D., Whittam, T., Riddell, C., Goodhope, R., Potter, A. A., and Allan, B., "*Escherichia coli* cellulitis in broiler chicken: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds" *Infection and Immunity*, 1996, 3118-3126.

- Nilus, A. M., Savage, D. C., "Serum resistance encoded by colicine V plasmids in *Escherichia coli* and its relationship to the plasmid transfer system". *Infection and Immunity*, 1984, 43: 947-953.
- Nolan, L. K., Wooley, R. E., Cooper, R. K., "Transposon mutagenesis used to study the role of complement resistance in the virulence of an avian *Escherichia coli* isolate" *Avian Diseases*, 1992a, 36: 398-402.
- Nolan, L. K., Wooley, R. E., Brown, J., Spears, K. R., Dickerson, H. W., and Dekich, M., "Comparison of a complement resistance test, a chicken embryo lethality test, and the chicken lethality test for determining virulence of avian *Escherichia coli*" *Avian Diseases*, 1992b, 36: 395-397.
- Nolan, L. K., Horne, S. M., Giddings, C. W., Foley, S. L., Johnson, T. J., Lynne, A. M., and Skyberg, J., "Resistance to serum complement, iss, and virulence of avian *Escherichia coli*" *Veterinary Research Communications*, 2003, 27(2): 101-10.
- Majó, N., El-Attrache, J., Banda, A., Villegas, P., Ramis, A., Páges, A. and Ikuta, N., "Molecular Characterization of Spanish Infectious Bursal Disease virus field isolates" *Avian Diseases*, 2001, vol.46 n° 4: 859-868.
- Margall, N., Domínguez, A., Prats, G., Salleras, L., "*Escherichia coli* Enterohemorrágico" *Revista Española de Salud Pública*, 1997, 71: 437-443.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino "El sector de la avicultura de puesta en cifras: principales indicadores económicos en 2007" Mayo de 2008. Subd. Gral. Mercados Exteriores y Producciones porcina, avícola y otras.
- Marois, C., Dufour-Gesbert, F. and Kempf, I., "Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction" *Veterinary Microbiology*, 2000, 73: 311-318.
- Marois, C., Dufour-Gesbert, F. and Kempf, I., "Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in environmental samples" *Avian Pathology*, 2002, 31: 163-168.
- Maslow, J. N., Mulligan, M. E., and Arbeit, R. D., "Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms" *Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1993, 17: 153-162.

- Matthijs, M. G. R., van Eck, J. H. H., de Wit, J. J., Bouma, A., and Stegeman, J., "Effect of IBV-H120 vaccination in broilers on colibacillosis susceptibility after infection with a virulent Massachusetts-type IBD strain" *Avian Diseases*, 2005, 49, 540-545.
- Maurer, J. J., Brown, T. P., Steffens, W. L., and Trayer, S. G., "The occurrence of ambient temperature-regulated adhesions, curli and the temperature-sensitive hemagglutinin *tsh* among avian *Escherichia coli*" *Avian diseases*, 1998, 42(1):106-18.
- Mbuthia, P.G., Njagi, L.W., Nyaga, P.N., Bebora, L.C., Minga, U., Kamundia, J. and Olsen, J.E., "*Pasteurella multocida* in scavenging family chickens and ducks: carrier status, age susceptibility and transmission between species" *Avian Pathology*, 2008, 37(1): 51-57.
- McNulty, M. S., "Chicken anemia agent: a review" *Avian Pathology*, 1991, 20: 187-203.
- McPeake, S. J. W., Smyth, J. A., and Ball, H. J., "Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds" *Veterinary Microbiology*, 2005, 110: 245-253.
- Mekkes, D. R., and Feberwee, A., "Real-time polymerase chain reaction for the qualitative and quantitative detection of *Mycoplasma gallisepticum*" *Avian Pathology*, 2005, 34(4): 348-354.
- Melamed, D., Leitner, G., Dan Heller, E., "A vaccine against avian colibacillosis based on ultrasonic inactivation of *Escherichia coli*" *Avian Diseases*, 1991, 35: 17-22.
- Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C. M., Curtiss, R., Peter, K. Brown, Pascal, A, Brée, A., Desautels, C., and Fairbrother, J. M., "Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity" *Infection and Immunity*, 2003a, 536-540.
- Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C. M., Curtiss, R., Lehoux B., and Fairbrother J. M., "Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages" *Infection and Immunity*, 2003b, 494-503.
- Meng, J., Zhao, S., Zhao, T. and Doyle, M. P., "Molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates by pulsed-field gel electrophoresis and plasmid DNA analysis" *Journal of Medical Microbiology*, 1995, 42: 258-263.

- Messier, S., Quessy, S., Robinson, Y., Devriese, L.A., Homme, J., Fairbrother, J. M., "Focal dermatitis and cellulitis in broiler chickens: bacteriological and pathological findings" *Avian Diseases*, 1993, 37: 839-844.
- Miflin, J. K., Chen, X. and Blackall, P. J., "Molecular characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from China by ribotyping" *Avian Pathology*, 1997, 26(1): 119-127.
- Miles, T. D., McLaughlin, W., and Brown, P., "Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans" *Veterinary Research*, 2006, 2:7.
- Mockett, A. P. A., Deuter, A. and Southee, D. J., "Fowlpox Vaccination: routes of inoculation and pathological effects" *Avian Pathology*, 1990, 19: 613-625.
- Mokady, D., Gophna, U., and Ron, E. Z., "Extensive Gene Diversity in Septicemic *Escherichia coli* Strains" *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, vol. 43, n° 1: 66-73.
- Monroy, M. A., Knöbl, T., Bottino, J. A., Astolfi, C. S., and Ferreira, A. J., "Virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates obtained from broiler breeders with salpingitis" *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2005, 28: 1-15.
- Mora, A., Blanco, M., Blanco, J. E., Blanco, J., "Prevalencia, serotipos y genes de virulencia de los *Escherichia coli* verotoxigénicos (O157 y no O157) en el ganado y carne de bovino" *Rev. Epidem. Med. Prev.*, 2003, 1: 34-36.
- Mora, A., León, S. L., Blanco, M., Blanco, J. E., López, C., Dahbi, G., Echeita, A., Gonzalez, E. A., Blanco, J., "Phagotypes, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Perú)" *International Journal of Food Microbiology*, 2007, vol. 114, 2: 204-210.
- Morales, O., Cardoso, B., "Anemia Infecciosa de las gallinas" *Lohmann Animal Health*, 2005.
- Morley, A. J., Thomson, D. K., "Swollen head syndrome in broiler chickens" *Avian Diseases*, 1984, 28: 238-243.
- Morris, J. A., and Sojka, W. J., "*Escherichia coli* as a pathogen in animals" In: *The virulence of E. coli*. Ed: Sussman, M. Pp. Academic Press, Londres, 1985: 47-77.
- Morris, J. A., "Poultry health issue", *Poultry Times*, 1989, 3:11.

- Müller, H., Rafiqul, Md., and Raue, R., "Research on Infectious bursal disease- the past, the present and the future" *Veterinary Microbiology*, 2003, 97: 153-165.
- Ojkic, D., Swinton, J., Vallieres, M., Martin, E., Shapiro, J., Sanei, B and Binnington, B., "Characterization of field isolates of infectious laryngotracheitis virus from Ontario" *Avian Pathology*, 2006, 35(4): 286-292.
- Old, D. C., Threlfall, E. J., "Salmonella" In: *Microbiology and microbial infections*, 1998, Vol. 2. 9 ed. Edited by Balows, A. and Duerden, B. I.
- Ons, E., Bleyen, N., Tuntufye, H. N., Vandemaele, F., Goddeeris, B. M., "High prevalence iron receptor genes of avian pathogenic *Escherichia coli*" *Avian Pathology*, 2007, 36(5): 411-414.
- Organización Mundial de la Salud, OMS, Red Internacional de las Autoridades en materia de inocuidad de los alimentos (INFOSAN) "Brote de *Escherichia coli* O157:H7 en espinacas" 2007, nota informativa de INFOSAN N°01/2007.
- Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE, ficha técnica de la Enfermedad, Influenza aviar, http://www.oie.int/esp/maladies/fiches/e_A150.htm.
- Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE, Red de vigilancia de enfermedades transmitidas por los alimentos, Nota de Información INFOSAN N° 6/2005 - WHO Global Salm-Surv, 20 de octubre de 2005.
- Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE, Terrestrial Manual 2008 "Verocytotoxigenic *Escherichia coli*" Chapter 2.9.11: 1294-1304.
- Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE, Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004. Viruela aviar, capítulo 2.7.12. 998-1004.
- Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE, ficha técnica de la Enfermedad, Newcastle Disease, http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_a160.htm.
- Orskov, F and Orskov, I., "*Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals" *Canadian Journal of Microbiology*, 1992, 38(7): 699-704.
- Parreira, V. R., Arns, C. W., and Yano, T., "Virulence factors of avian *Escherichia coli* associated with swollen head syndrome" *Avian Pathology*, 1998, 27(2): 148-154.
- Parveen, S., Hodge, N. C., Stall, R. E., Farrah, S. R., Tamplin, M. L., "Phenotypic and genotypic characterization of human and nonhuman *Escherichia coli*" *Water Research*, 2001, vol. 35 n° 2: 379-386.

- Peighambari, S. M., Julian, R. J., Vaillancourt, J. P., Gyles, C. L., "Escherichia coli cellulitis: experimental infections in broiler chickens" Avian Diseases, 1995, 29: 125-134.
- Pfaff-McDonough, S. J., Horne, S. M., Giddings, C. W., Ebert, J. O., Doertkott, C., Smith, M. H., and Nolan, L. K., "Complement resistance-related traits among Escherichia coli isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis" Avian Diseases, 2000, 44(1): 23-33.
- Piercy, D. W. T., West, B., "Experimental Escherichia coli infection in broiler chickens: course of the disease induced by inoculation via the air sac route" Journal of Comparative Pathology, 1976, 203-210.
- Pinheiro, L. A., de Oliveira, G. H., and Berchieri, A., "Experimental Salmonella enterica serovar Pullorum infection in two commercial varieties of laying hens" Avian Pathology, 2001, 30: 129-133.
- Pourbakhsh, S. A., Dho-Moulin, M., Bree, A., Desautels, C., Martineau-Doize, B., and Fairbrother, J. M., "Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic Escherichia coli" Microbial Pathogenesis, 1997, 22: 331-341.
- Poveda, J. B., Carranza, J., Miranda, A., Garrido, A., Hermoso, M., Fernández, A., and Doménech, J., "An epizootiological study of avian micoplasmas in southern Spain" Avian Pathology, 1990, 19: 627-633.
- Privitera, A., Licciardello, L., Gianninò, V., Agodi, A., Rappazzo, G., Nicoletti, G., Stefani, S. "Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Haemophilus parainfluenzae from chronic obstructive pulmonary disease exacerbations" European Journal of Epidemiology, 1998, 14(4): 405-12.
- Provence, D. L and Curtiss, R., "Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic Escherichia coli strain" Infection and Immunity, 1994, 62(4): 1369-80.
- Pruijboom-Brees, I. M., Morgan, T. W., Ackermann, M. R., Nystrom, E. D., Samuel, J. E., Cornick, N. A., and Moon H. W., "Cattle lack vascular receptors for Escherichia coli O157:H7 Shiga toxins" Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America, 2000, vol 97; 19:10325-10329.

- Queipo-Ortuño, M. I., De Dios Colmenero, J., Macias, M., Bravo, M. J., Morata, P., "Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR from serum samples of patients with brucellosis". *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, 12.
- Rabsch, W., "Competitive exclusion os *Salmonella enteritidis* by *S. gallinarum* poultry" *Emerging Infection Diseases*, 2000, 6: 443-448.
- Randall, C. J., Meakins, P. A., Harris, M. P., Watt, D. J., "A new skin disease in broilers" *The Veterinary Record*, 1984, 114, 246.
- Radu, S., Ling, O. W., Rusul, G., Abdul Karim, M. I., and Nishibuchi, M., "Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses" *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 46: 131-139.
- Rakin, A., Urbitsch, P., Heesemann, J., "Evidence for two evolutionary lineages of highly pathogenic *Yersinia* species" *Journal of Bacteriology*, 1995, 177: 2292-2298.
- Rashid, R. A., Tabata, T. A., Oatley, M. J., Besser, T. E., Tarr, P. I. and Moseley, S. L., "Expression of putative virulence factors of *Escherichia coli* O157:H7 differs in bovine and human infections" *Infection and Immunity*, 2006, 4142-4148.
- Real Decreto 2210/1995, 28 de Diciembre por la que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. BOE núm 21, 24/01/1996.
- Renter, D., Sargeant, J. M., Oberst, R., Samadpour, M., "Diversity, frequency and persistence of *Escherichia coli* O157 strains from range cattle environments" *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 542-547.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., "Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión" *Medicina Buenos Aires*, 2006, 66 (3): 27-32.
- Rodriguez-Angeles, M., "Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*" *Salud pública de México*, 2002, vol. 44, nº5.
- Rosario, C., López, A. C., Téllez, I. G., Navarro, O. A., Anderson, R. C., Eslava, C. C., "Serotyping and virulence genes detection en *Escherichia coli* isolated from fertile and infertile eggs, dead-in-shell embryos, and chickens with yolk sac infection" *Avian Diseases*, 2004, 48 (4): 791-802.

- Rosenberg, J. K., Fries, P. A., Cloud, S. S., "In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*" Avian Diseases, 1985, 29: 1108-1117.
- Ron, E. Z., "Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens" Current Opinion in Microbiology, 2006, 9: 1-5.
- Schat, K.A. "Chicken Anemia" 11th ed. Disease of Poultry, 2003, Section 1 Chapter 7.
- Schroeder, C. M., Meng, J., Zhao, S., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, C., McDermott, P. F., Wagner, D. D., Walker, R. D., White, D. G., "Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans" Emerging Infectious Diseases, 2004, 8 (12):1409-14.
- Schubert, S., Raki, A., Karch, H., Carniel, E., and Heesemann, J., "Prevalence of the High-Pathogenicity Island of Yersinia species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans" Infection and Immunity, 1998, 480-485.
- Schwartz, D., and Cantor, C., "Separation of yeast chromosome sized ADNs by Pulsed-field gradient gel electrophoresis" Cell, 1984, 37: 67-75.
- Shane, S. M., "Colisepticemia: cause, prevention in commercial broiler flocks". Poultry Digest, 1981, 40: 370-374.
- Shivachandra, S. B., Kumar, A. A., Gautam, R., Saxena, M. K., Chaudhuri, P., and Srivastava, S. K., "Detection of multiple strains of *Pasteurella multocida* in fowl cholera outbreaks by polymerase chain reaction-based typing" Avian Pathology, 2005, 34 (6): 456-462.
- Siek, K., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J., and Nolan, L. K., "Characterizing the APEC pathotype" Veterinary Research, 2005a, 36, 241-256.
- Siek, K., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J., Fakhr, M. K., and Nolan, L. K., "Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis" Microbiology, 2005b, 151: 2097-2110.
- Skyberg, J., Shelley, M., Horne, Giddings, C. W., Wooley, R. E., Gibbs, P. S., and Nolan, L. K., "Characterizing avian *Escherichia coli* isolates with multiplex polymerase chain reaction" Avian Diseases, 2003, 47: 1441-1447.
- Skyberg, J. A., Johnson, T. J., Johnson, J. R., Clabots, C., Logue, C. M. and Nolan, L. K., "Acquisition of Avian Pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli*

- isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney" *Infection and Immunity*, 2006, vol. 74, n° 11: 6287-6292.
- Smith, H. R., Cook, J. K. A., and Parsell, Z. E., "The experimental infection of chickens of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*" *The Journal of General Virology*, 1985, 66: 777-786.
 - Söderström, A., Osterberg, P., Lindqvist, A., Jönsson, B., Lindberg, A., Blide Ulander, S., Welinder-Olsson, C., Löfdahl, S., Kaijser, B., De Jong, B., Kühlmann-Berenzon, S., Boqvist, S., Eriksson, E., Szanto, E., Andersson, S., Allestam, G., Hedenström, I., Muller, L., and Andersson, Y., "A large *Escherichia coli* O157 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce" *Foodborne Pathogens and Disease*, 2008, 5(3): 339-49.
 - Sojka, W. J., Carnahan, R. B. A., "Escherichia coli infection in poultry" *Research in Veterinary Science*, 1961, 2: 340-353.
 - Someya, A., Otsuki, K., and Murase, T., "Characterization of *Escherichia coli* strains obtained from layer chickens affected with Colibacillosis in a commercial egg producing farm" *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2007, 69(10): 1009-1014.
 - Sumano, H. y Ocampo, L., "Nitrofuranos, bacitracinas y polimixinas" *Farmacología Veterinaria 3ª edición*, 2006, 16: 293-304.
 - Suwanichkul, A., and Panigrahy, B., "Biological and immunological characterization of pili of *Escherichia coli* serotypes O1, O2 and O78 pathogenic to poultry" *Avian Diseases*, 1986a, 30: 781-787.
 - Suwanichkul, A., Panigrahy, B., and Wagner, R. M., "Antigenic relatedness and partial amino acid sequences of pili of *Escherichia coli* serotypes O1, O2 and O78 pathogenic to poultry" *Avian Diseases*, 1986b, 31: 809-813.
 - Swayne, D. E., and Halvorson, D. A., "Influenza" 11th Edition *Disease of Poultry*, 2003, Section I, Chapter 5.
 - Synge, B. A., "Recent epidemiological studies of verocytotoxin-producing *E. coli* O157 in Cattle in Scotland" *Cattle Practice*, 2000, 8: 341-343.
 - Tannock, G. A., and Shafren, D. R., "Avian encephalomyelitis: a review" *Avian Pathology*, 1994, 23: 603-620.

- Tamaki, Y., Narimatsu, H., Miyazato, T., Nakasone, N., Higa, N., Toma, C., and Iwanaga, M., "The relationship between O-antigens and pathogenic genes of diarrhea-associated *Escherichia coli*" Japanese Journal of Infectious Diseases, 2005, 58: 65-69.
- Thampuran, N., Surendraraj, A., Surendran, P. K. J., "Prevalence and characterization of typical and atypical *Escherichia coli* from fish sold at retail in Cochin, India" Journal of Food Protection, 2005, 68(10): 2208-11.
- Thiagarajan, D., Saeed, A. M., and Asem, E. K., "Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella enteritidis* in laying hens" Poultry Science, 1994, 73: 89-98.
- Tivendale, K. A., Allen, J. L., Ginns, C. A., Crabb, B. S., and Browning, G. F., "Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*" Infection and Immunity, 2004, 6554-6560.
- Téllez, S. "Estudio de la frecuencia de detección y caracterización de aislados de *Salmonella* spp. Obtenidos de reptiles y anfibios". Tesis Doctoral 2003, Facultad de Veterinaria, UCM.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persin, D. H., and Swaminathan, B., "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strains typing." Journal of Clinical Microbiology, 1995, 2233-2239.
- Todar, K., "Pathogenic *E. coli*" en <http://www.textbookofbacteriology.net/> University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology, 2008.
- Trampel, D. W., Wannemuehler, Y., Nolan, L. K., "Characterization of *Escherichia coli* isolates from peritonitis lesions in commercial laying hens" Avian Diseases, 2007, 51: 840-844.
- Tripathy, D. N., and Reed, W. M., "Neoplastic Diseases" 11th Edition Disease of Poultry, 2003, Section I, Chapter 15.
- Tsai, S. S, Chang, T. C., Yang, S. F., Chi, Y. C., Cher, R. S., Chien, M. S. and Itakura, C., "Unusual lesions associated with avian poxvirus infection in rosy-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*)" Avian Pathology, 1997, 26, 75-82.
- Tutenel, A., Pierard, D., Uradzinski, J., Jozwik, E., Partuszcak, M., Van Hende, J., Uyttendaele, M., Debevere, J., Cheasty, T., Van Hoof, J., De Zutter, L. "Isolation and

- characterization of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 from cattle in Belgium and Poland" *Epidemiology and Infection*, 2002, 129 (1): 41-47.
- Valiente, C., Chauve, C., and Zenner, L., "Vectorial role of some dermanyssoid mites (*Acari, Mesostigmata, Dermanyssoidea*)" *Parasite*, 2005, 12(2): 99-109.
 - Valiente, C., Chauve, C., and Zenner, L., "Experimental infection of *Salmonella* Enteritidis by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*" *Veterinary Parasitology*, 2007a, 146(3-4): 329-336.
 - Valiente, C., Desloire, S., Chauve, C., and Zenner, L., "Detection of *Salmonella* sp. in *Dermanyssus gallinae* using an FTA filter-based polymerase chain reaction" *Medical and Veterinary Entomology*, 2007b, 21(2): 148-152.
 - Vandekerchove, D., Herdt, P. D., Laevens, H., Butaye, P., Meulemans, G., and Pasmans, F., "Significance of interactions between *Escherichia coli* and respiratory pathogens in layer hen flocks suffering from colibacillosis-associated mortality" *Avian Pathology*, 2004a, 33(3): 298-302.
 - Vandekerchove, D., De Herdt, P., Laevens, H. and Pasmans, F., "Risk factors associated with colibacillosis outbreaks in caged layer flocks" *Avian Pathology*, 2004b, 33(3): 337-342.
 - Vandekerchove, D., De Herdt, P., Laevens, H. and Pasmans, F., "Colibacillosis in caged layer hens: characteristics of the disease and the aetiological agent" *Avian Pathology*, 2004c, 33(2): 117-125.
 - Vandekerchove, D., Vandemaele, F., Adriaensen, C., Zaleska, M., Hernalsteens, J. P., De Baets, L., Butaye, P., Van Immerseel, F., Wattiau, P., Laevens, H., Mast, J., Goddeeris, B., and Pasmans, F., "Virulence associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks" *Veterinary Microbiology*, 2005, 108: 75-87.
 - Van den Berg, T. P., Gonze, M., and Meulemans, G., "Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain" *Avian Pathology*, 1991, 20: 133-143.
 - Van den Bogaard, A. E., London, N., Driessen, C. and Stobberingh, E. E., "Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers" *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 47: 763-771.

- Van den Bosch, J. F., Hendriks, J. H. I. M., Gladigau, I., Willems, H. M. C., Storm, P. K., and De Graaf, F. K., "Identification of F11 fimbria on chicken *Escherichia coli* strain" *Infection and Immunity*, 1993, 61: 800-806.
- Vela, A. I., Vázquez, J., Gibello, A., Blanco, M. M., Moreno, M. A., Liébana, P., Albendea, C., Alcalá, B., Mendez, A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J. F. "Phenotypic and genetic characterization of *Lactococcus garvieae* isolated in Spain from lactococcosis outbreaks and comparison with isolates of other countries and sources". *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(10): 3791-5.
- Venupogal, K., "Marek's disease: an update on oncogenic mechanisms and control" *Research in Veterinary Science*, 2000, 69(1): 17-23.
- Vidotto, M. C., Müller, E. E., Freitas, J. C., Alfieri, A. A., Guimaraes, I. G. and Santos, D. S., "Virulence factors of avian *Escherichia coli*" *Avian Diseases*, 1990, 34: 531-538.
- Vidotto, M., Navarro, H. R., Gaziri, L., "Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*" *Veterinary Microbiology*, 1997, 59: 79-85.
- Walters, V. L., and Crosa, J. H., "Colicin V virulence plasmids" *Microbiological Reviews*, 1991, 437-450.
- White, D. G., Wilson, R. A., San Gabriel, A., Saco, M., Whittam, T. S., "Genetic relationships among of avian *Escherichia coli* associated with swollen-head syndrome. *Infection and Immunity*, 1990, 58, 3613-3620.
- White, D. G., Wilson, R. A., Emery, D. A., Nagaraja, K. V., Whittam, T. S., "Clonal diversity among strains of *Escherichia coli* incriminated in turkey colisepticemia" *Veterinary Microbiology*, 1993, 34: 19-34.
- Whittam, T. S. and Wilson R. A., "Genetic relationships among pathogenic strains of avian *Escherichia coli*" *Infection and immunity*, 1988, 2458-2466.
- Witter, R. L., "Neoplastic Diseases" 11th Edition *Disease of Poultry*, 2003, Section I, Chapter 15.
- Woo, Y., and Kim, J., "Fowl Cholera outbreak in domestic poultry and epidemiological properties of *Pasteurella multocida* isolate" *The Journal of Microbiology*, 2006, 344-353.

- Wooley, R. E., Spears, E., Brown, J., Nolan, L. K., and Fletcher, O. J., "Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*" *Avian Diseases*, 1992, 36: 679-684.
- Wooley, R. E., Nolan, L. K., Brown, J., Gibbs, P. S., Bounous, D. I., "Phenotypic expression of recombinant plasmids pKT107 and pHK11 in an avirulent avian *Escherichia coli*" *Avian Diseases*, 1994, 38(1): 127-34.
- Wooley, R. E., Brown, J., Gibbs, P. S., Nolan, L. K. and Turner, K. R., "Effect of normal intestinal flora of chickens on colonization by virulent colicin V-producing, avirulent, and mutant colicin V-producing avian *Escherichia coli*" *Avian Diseases*, 1994, 38: 141-145.
- Wooley, R. E., Nolan, L. K., Brown, J., Gibbs, P. S., Giddings, C. W., and Turner, K. S., "Association of K-1 capsule, smooth lipopolysaccharides, traT gene, and colicin V production with complement resistance and virulence of avian *Escherichia coli*" *Avian Diseases*, 1993, 37: 1092-1096.
- Wooley, R. E., Gibbs, P. S., Brown, T. P., Glisson, J. R., Steffens W. L., Maurer, J. J., "Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11" *Avian Diseases*, 1998, 42: 194-198.
- Yang, H., Chen, S., White, D., Zhao, S., McDermott, P., Walker, R., Meng, J., "Characterization of multiple antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China" *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, p. 3483-3489.
- Yerushalmi, Z., Smorodinsky, N. I., Naven, M. W., Ron, E. Z., "Adherent pili in avian strains of *Escherichia coli* O78" *Infection and Immunity*, 1990, 58: 1129-1131.
- Yuste, M. "Caracterización de estirpes de *Escherichia coli* productoras de la lesión de adhesión y borrado de rumiantes y cinética de anticuerpos frente a la intimina beta en cabritos" Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, UCM, 2006.

